

Considérations sur la recherche de l'Indol et quelques faits concernant la Biologie du Colibacille

THÈSE

*Présentée et soutenue publiquement le 30 Juin 1934
à la Faculté de Pharmacie de Nancy*

POUR OBTENIR LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Pharmacie)

PAR

Jacques SPILLMANN
Pharmacien

Né le 1^{er} Septembre 1902 à Nancy

Examineurs

MM. le Professeur LASSEUR.
— VERNIER.
— CORDEBARD.

IMPRIMERIE ARTS GRAPHIQUES
NANCY

1934

Considérations sur la recherche de l'Indol et quelques faits concernant la Biologie du Colibacille

THÈSE

*Présentée et soutenue publiquement le 30 Juin 1934
à la Faculté de Pharmacie de Nancy*

POUR OBTENIR LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Pharmacie)

PAR

Jacques SPILLMANN

Pharmacien

Né le 1^{er} Septembre 1902 à Nancy

Examineurs

MM. le Professeur LASSEUR.

— VERNIER.

— CORDEBARD.

IMPRIMERIE ARTS GRAPHIQUES
NANCY

1934

UNIVERSITÉ DE NANCY — FACULTÉ DE PHARMACIE

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen honoraire

M. BRUNTZ, *, ☼, I O ☼, ✕, ✕, Recteur de l'Université de Nancy.

Professeurs honoraires

MM. FAVREL, *, I O.

BRUNTZ, *, ☼, I O ☼, ✕, ✕.

Doyen

M. SEYOT, *, ☼, I O, ☼, ✕.

Assesseur

M. GILLOT, I O, ☼.

Professeurs

MM.

GRELOT, *, I O, ☼	Pharmacie galénique.
DOURIS, I O, ☼, ✕	Toxicologie.
PASTUREAU, O *, I O, ✕	Pharmacie chimique.
SEYOT, *, ☼, I O, ☼, ✕	Histoire naturelle.
LASSEUR, *, I O, ☼	Microbiologie.
GILLOT, I O, ☼	Matière médicale.
PRÉVOST (C. G.)	Chimie organique.

Agrégé libre

M. GIRARDET, *, I O. Chimie et Toxicologie.

Chargés de cours

MM.

PASTUREAU O *, I O, ✕	Chimie biologique.
DONZELOT	Physique.
VERNIER, I O	Zoologie.
SIMONNET, I O	Législation et Déontologie.
GILLOT, I O, ☼	Pharmacotechnie.
CORDEBARD, ☼, I O	Analyse chimique.
SEYOT, *, ☼, I O, ☼, ✕	Hygiène.

Chefs de travaux

MM.

VERNIER, I O	Microbiologie et Parasitologie.
MEUNIER	Pharmacie.
CORDEBARD, ☼, I O	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ	Micrographie.
DONZELOT (chargé de travaux)	Physique.
DIVOUX (chargé de travaux)	Chimie biologique et Toxicologie

Secrétariat

M. E. TRIBOLET, I O. Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A MON PÈRE

M. LE PROFESSEUR LOUIS SPILLMANN

INTRODUCTION

Pour identifier une espèce bactérienne et lui attribuer une place dans la systématique, le microbiologiste utilise :

- 1° Les caractères morphologiques.
- 2° Les caractères cultureux.
- 3° Les propriétés sérologiques.

La propriété qu'ont certains germes de produire de l'indol appartient à la 2^e catégorie. On sait que l'indol prend naissance dans les milieux de culture, sous l'action des Bactéries et aux dépens de noyaux tryptophaniques.

En entreprenant ce travail, notre but fut tout d'abord de choisir une bonne méthode pour mettre en évidence l'indol dans les cultures microbiennes. Nous avons été ensuite conduits à étudier les variations possibles de la fonction indologène d'une espèce bactérienne; notre choix s'est porté sur le Colibacille, parce que, comme nous le verrons au cours de cette étude, c'est à propos de ce germe que la réaction de l'indol est le plus souvent effectuée dans les laboratoires.

Ce travail est composé de trois parties principales. La première partie comporte :
1° L'étude des quatre réactions les plus communément employées dans les laboratoires

2° Le choix d'une bonne technique de recherche de l'indol dans les cultures microbiennes. 3° Un tableau résumant les résultats obtenus en recherchant l'indol dans les cultures de diverses espèces microbiennes.

La deuxième partie est consacrée à quelques recherches sur la biologie du colibacille : 1° A l'étude de sa fonction indologène et du comportement de cette fonction sous l'influence de divers facteurs. 2° A l'étude de sa persistance dans l'eau sous des conditions variées.

La troisième partie enfin, met en évidence l'intérêt qu'il y a à adopter les milieux synthétiques chimiquement définis, au lieu de l'eau peptonée, pour l'étude de la fonction indologène des Bactéries.

AVANT-PROPOS

Nous avons entrepris cette thèse sur les indications de M. le Professeur Lasseur. Il a été pour nous un maître particulièrement bienveillant. Après nous avoir accueilli dans son laboratoire, si largement ouvert à tous les jeunes travailleurs, après nous avoir initié à la recherche scientifique, il a tenu à nous guider au cours de notre travail et ne nous a pas ménagé ses précieux conseils.

Nous lui adressons l'expression de notre vive gratitude pour son haut enseignement et pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider notre soutenance de thèse. Qu'il veuille bien nous permettre d'adresser notre respectueux hommage à M^{me} Dupaix-Lasseur, en la remerciant des recherches qu'elle a bien voulu nous faire.

M. le Recteur Bruntz a bien voulu nous guider au cours de nos études pharmaceutiques. Nous lui sommes très reconnaissants de l'affectueux intérêt qu'il n'a cessé de nous témoigner.

Nous avons trouvé à la Faculté de Pharmacie de Paris un très encourageant appui auprès de M. le Doyen Radais. Nous n'oublierons pas les facilités qu'il a bien voulu nous accorder et nous nous souviendrons de l'aimable accueil qui nous a été réservé par M. le Doyen Seyot à la Faculté de Pharmacie de Nancy.

M. le Docteur Vernier et M. Cordebard nous ont toujours

reçu avec une très grande cordialité. Notre très vive gratitude leur est acquise. Nous ne saurions trop remercier M. Deval, chef des travaux à la Faculté de Pharmacie de Paris, pour la bienveillante hospitalité qu'il a bien voulu nous donner dans son laboratoire.

Nous avons dû souvent faire appel au concours éclairé de notre camarade Marchal. L'aide si amicale qu'il n'a cessé de nous apporter nous a beaucoup touché.

Notre très sincère reconnaissance s'adresse enfin à MM. les Professeurs Vincent et de Graaff, à MM. les Docteurs Berthelot, Hauduroy et Kopaczewski pour les précieux renseignements qu'ils nous ont procurés.

Nous réunissons dans le même hommage de gratitude tous ceux qui par leurs conseils et leur aimable appui, ont facilité notre tâche.

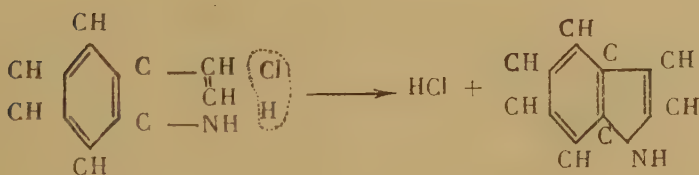
PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR L'INDOL

L'indol est un corps appartenant au groupe de l'indigo. Son nom lui vient de ce qu'il prend naissance quand on soumet l'indigo naturel à la distillation sèche avec de la poudre de zinc. C'est du phéno-pyrrol.

Sa synthèse a été réalisée par LIPP, en partant de l'orthoaminochlorostyrolène, auquel on soustrait les éléments de l'acidechlorhydrique à l'aide de la potasse alcoolique (MOUREU).



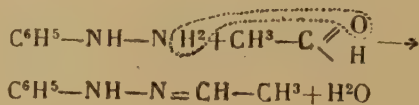
Orthoaminochlorostyrolène.

Indol.

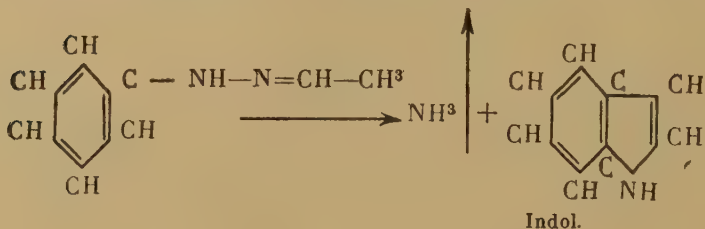
D'après PORCHER, le procédé général de synthèse des indols est le suivant :

On traite par ZnCl^2 à chaud les phénylhydrazones des aldéhydes et des cétones.

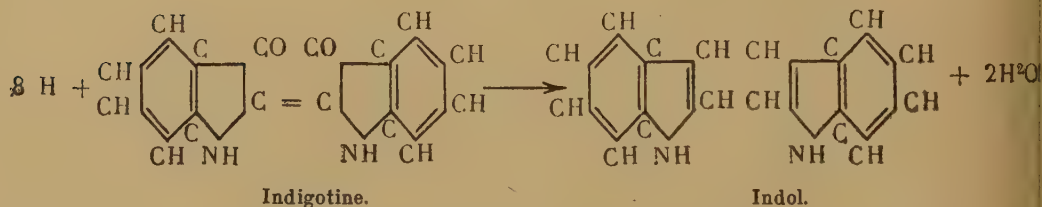
Pour l'indol en particulier, on part de l'aldéhyde ordinaire, la réaction se passe suivant la formule ci-jointe :



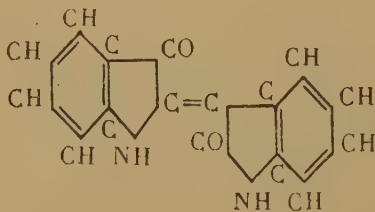
Par condensation avec le ZnCl^2 on obtient :



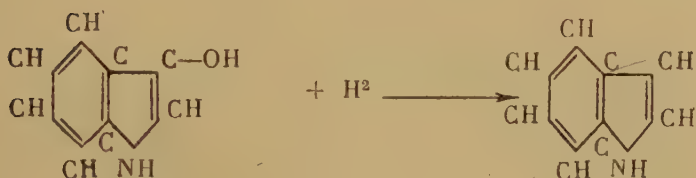
La réduction de l'indigotine (1) par l'étain et l'acide chlorhydrique puis par le Zn en poudre à chaud donne également de l'indol :



(1) Le terme d'indigotine est réservé à l'indigo proprement dit en opposition avec son isomère l'indirubine.



Actuellement l'indol que l'on trouve dans le commerce est préparé à partir de l'indoxyl. Ce corps constitue une étape de la préparation industrielle de l'indigo synthétique. Par réduction à l'aide du zinc en poudre en solution alcaline, on passe de l'indoxyl à l'indol.



L'indol existe, à l'état naturel, dans les essences végétales (fleur d'oranger).

Il prend naissance dans les milieux de culture contenant un noyau tryptophanique, à la suite de l'attaque de ce corps par certains germes dits indologènes.

C'est comme le dit Louis GAUTHIER : « un produit régulier de la décomposition de nature putréfactive de toutes les matières albuminoïdes végétales ou animales ».

Propriétés de l'indol.

1° L'indol est un corps solide, cristallisé en belles paillettes possédant une odeur aromatique;

2° Il fond à 52° C., son point d'ébullition est à 254° C.;

3° Il est très volatil et entraînable par la vapeur d'eau;

4° L'indol est très peu soluble dans l'eau froide, un peu plus soluble dans l'eau chaude;

5° Il est très soluble dans l'alcool, l'éther ordinaire, le chloroforme, le benzène, et l'éther de pétrole;

6° Les solutions éthérées se conservent mal, il faut conserver l'indol en solution alcoolique ;

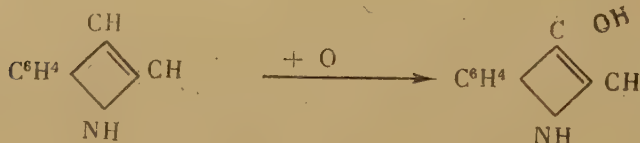
7° Les solutions alcooliques d'indol doivent être conservées dans des flacons en verre jaune bien bouchés et à l'abri de la lumière ;

8° L'indol ne possède pas de pouvoir rotatoire ;

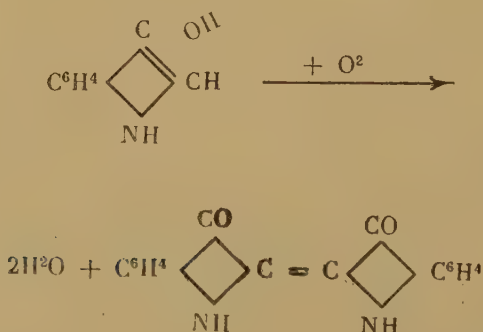
9° Pur, l'indol possède une odeur agréable qui l'a fait employer en parfumerie.

Caractérisation de l'indol.

L'indol est identifié d'une façon sûre par sa transformation en indigo. D'après PORCHER et NICOLAS l'indol s'oxyde sous l'influence de l'eau oxygénée pour donner de l'indoxyle.



« A son tour, l'indoxyle en présence des alcalis, s'oxyde très facilement même à l'air pour donner de l'indigotine ou bleu d'indigo ».



Indigotine.

L'indol dans les cultures microbiennes.

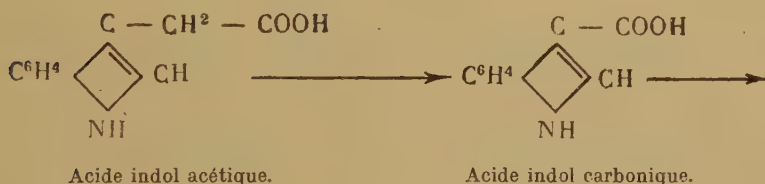
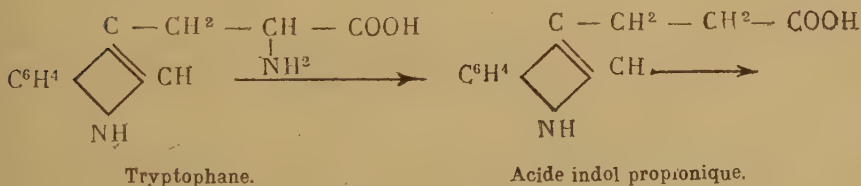
FORMATION D'INDOL A PARTIR DU TRYPTOPHANE D'APRÈS SALKOWSKI

Nous avons vu que l'indol prend naissance dans les milieux de culture contenant un noyau tryptophanique, soumis à l'attaque des germes microbiens.

Cette désagrégation, d'après SALKOWSKI, se ferait en deux étapes :

La première allant du tryptophane jusqu'à l'acide indol acétique par scission de l'atome C en α du groupe amidé (résidu $\text{CH}-\text{NH}^2$).

La seconde allant de l'acide indol, acétique jusqu'à l'indol; elle serait franchie seulement par les germes indologènes.



Le germe microbien ne réalise donc pas une synthèse de l'indol à partir de constituants simples. Il faut au contraire dans le milieu de culture des complexes organiques enfermant des noyaux qui par dédoublement, dislocation, soient susceptibles de donner naissance à de l'indol.

Le tryptophane paraît bien être la source principale de l'indol. Il est probable qu'il n'en constitue pas l'unique origine. Cette conception est confirmée par PORCHER qui dit à ce sujet :

« Le tryptophane n'est peut-être pas, entre tous les tronçons de la molécule protéique, le seul qui puisse être capable de donner de l'indol et du scatol par un dédoublement ultérieur chimique ou microbien. »

CHAPITRE II

LES RÉACTIONS QUALITATIVES DE L'INDOL

Dans les premiers temps de la microbiologie, on a surtout utilisé la morphologie pour l'identification des espèces microbiennes. Mais on s'aperçut bien vite qu'elle était incapable à elle seule de définir une espèce (LASSEUR, 1913). En effet, des facteurs nombreux et divers agissent sur la forme de la bactérie: une même espèce peut offrir des aspects morphologiques très différents. MARCHAL (1932) écrit : « Avant de se prononcer sur l'identité du type en présence duquel on se trouve, il est de toute nécessité d'avoir recours à plusieurs caractères. »

La production d'indol par les germes indologènes constitue un de ces caractères.

La recherche qualitative de l'indol est souvent effectuée en bactériologie. Sa présence est toujours mise en évidence dans les cultures, à l'aide de réactions colorées.

Malheureusement, en ce qui concerne un trop grand nombre de germes, les auteurs ne sont pas toujours d'accord, pour déclarer si un germe est indologène ou non. Même pour le Colibacille réputé hautement indologène, des divergences de vue se sont manifestées. On peut cependant dire que la majorité des auteurs s'accorde pour attribuer au Colibacille des propriétés indologènes constantes. Les différences observées tiennent vraisemblablement, non seulement à l'espèce bactérienne considérée, mais encore à la technique employée pour déceler l'indol. Il nous a paru intéressant de faire une étude comparative des quatre réactifs employés le plus souvent dans les

laboratoires de microbiologie : les réactifs de DENIGÈS, EHRLICH, LEGAL et SALKOWSKI.

Nous allons esquisser un rapide historique de ces quatre réactions en relevant les principales opinions successivement émises à leur sujet.

1^o Étude du réactif à la vanilline de Denigès.

En 1908, DENIGÈS étudia plusieurs corps susceptibles d'être utilisés pour la recherche de l'indol. Il retint de cette étude la vanilline déjà signalée par RHODE (1905) et STEENSMA (1906), comme donnant une réaction colorée avec l'indol.

Le réactif de la vanilline offre, selon DENIGÈS, une sensibilité comparable à celle du réactif d'EHRLICH.

L'auteur fait une solution de vanilline à 0 gr. 20 dans 100 cm³ d'alcool. Il ajoute de 0 cm³ 5 à 1 cm³ de cette solution, à 5 cm³ de la solution alcoolique d'indol à examiner. Il verse ensuite dans le mélange la moitié de son volume au moins, soit 3 cm³ d'HCl pur ($D = 1,17$ à $1,18$) et agite pour mélanger.

Avec la vanilline, il se développe une coloration rouge éosine ou grenadine présentant dans le vert, à l'examen spectroscopique, une large bande d'absorption débordant sur le bleu.

La réaction permet de déceler 1/10^e de milligramme d'indol par litre. Quand il s'agit de solutions benzéniques d'indol, DENIGÈS recommande d'en agiter 10 cm³ avec 2 cm³ d'HCl pur, après addition de 0 cm³ 5 de solution alcooliques à 0,2 % de vanilline. Les colorations obtenues, très stables, se prêtent bien à un dosage colorimétrique de l'indol.

BUARD (1908) étudie comparativement la réaction de DENIGÈS et celle de NONOTTE et DEMANCHE (1). Il emploie

(1) Pour méthode de NONOTTE et DEMANCHE, voir page 18.

la technique suivante pour la réaction de DENIGÈS : à 10 cm³ de culture ayant séjourné de 15 à 20 heures à l'étuve à 37° C., on ajoute 5 à 6 cm³ d'alcool absolu. Après mélange, on verse 1 cm³ de solution alcoolique de vanilline à 0,2 % et 3 cm³ d'HCl pur. En présence d'indol, il se produit de suite une coloration rose qui va en augmentant. BUARD juge cette réaction supérieure à celle de NONOTTE et DEMANCHE. En effet, cette dernière méthode, quoique très sensible, lui a toujours donné des résultats moins nets et surtout d'une intensité 4 ou 5 fois moindre. Par le repos, ou bout d'une douzaine d'heures, le liquide s'éclaircit et la réaction méthode DENIGÈS reste invariable tandis que celle de NONOTTE et DEMANCHE tend vers le rose jaune et se trouble.

BLUMENTHAL (1909), parlant de la réaction à la vanilline, déclare qu'elle est parfaite tant qu'il s'agit de déceler de l'indol seul, mais qu'il n'en est plus de même si, dans le liquide au sein duquel on effectue la réaction, l'indol se trouve mêlé à du scatol; la réaction, dans ce cas, dit l'auteur, se révèle insuffisante.

NELSON (1916) signale qu'au cours de ses recherches il a obtenu de très bons résultats en employant la réaction à la vanilline, mais il met également en garde contre l'inconstance de ces résultats.

ZOLLER (1920) conseille de se méfier, même dans le cas où l'on distille le milieu de culture, d'homologues comme le nitroso-indol.

En 1923, le « Committee on Bacteriological technic of the Society of American Bacteriologists » recommande la technique suivante pour la réalisation de la réaction à la vanilline :

A 5 cm³ de culture, on ajoute 5 gouttes d'une solution à 5 % de vanilline dans l'alcool à 95° et 2 cm³ d'acide sulfurique concentré.

L'indol donne une couleur orange claire qui atteint son maximum d'intensité en deux ou trois minutes.

Le tryptophane donne d'autre part une coloration rouge violacée qui se développe plus lentement et s'intensifie avec le temps ou sous l'action de la chaleur.

IDA KRAUS (1925) étudie le réactif à la vanilline en tant que réactif du tryptophane.

Nous retiendrons de cette étude les observations suivantes intéressantes du point de vue de la vanilline considérée comme réactif de l'indol :

1° La vanilline, d'après l'auteur, ne donne aucune coloration avec la tyrosine, cystine, alanine, phénylalanine, histidine, glucosamine et leucine.

2° Les solutions alcooliques de vanilline, même fraîchement préparées, développent une coloration quand elles sont traitées par HCl concentré. De plus, ces solutions alcooliques ne sont pas stables.

3° Les solutions de vanilline dans l'acide acétique à 50 % sont stables et ne développent pas de coloration avec les acides forts.

FELLERS et CLOUGH (1925) déclarent que la réaction à la vanilline possède une sensibilité égale à celle du réactif d'EHRlich; toutefois, ils lui accordent une spécificité moins grande et parlent de substances qui, occasionnellement, peuvent masquer ou changer la couleur de la réaction même si elle est effectuée sur le distillat.

Les expériences faites par ces auteurs les conduisent à recommander l'emploi de l'acide chlorhydrique au lieu de l'acide sulfurique; on élimine ainsi les effets nuisibles de carbonisation de l'acide sulfurique sur les substances organiques habituellement présentes.

Dans une tentative pour perfectionner la réaction; les auteurs essayent un certain nombre de vanillines substituées : « *Méthylvanillin*, *Monobromvanillin*, *Benzidine mono Vanillin* ». Ces corps se montrent moins sensibles que la vanilline elle-même.

Toujours dans le même travail, FELLERS et CLOUGH signalent un moyen de séparation de l'indol et du scatol

à l'aide du réactif à la vanilline; la coloration bleue violette produite avec le scatol est entièrement soluble dans le chloroforme tandis que la coloration orange de l'indol est seulement très légèrement soluble.

Pour mettre en évidence ces deux corps, les auteurs préconisent le procédé suivant :

Effectuer la réaction, autant que possible, sur le distillat (distillation directe ou entraînement à la vapeur d'eau).

A 5 cm³ de la solution dans laquelle il faut rechercher l'indol et le scatol, ajouter 5 gouttes d'une solution à 5 % de vanilline dans l'alcool à 95°, puis 2 cm³ 5 d'HCl concentré et mélanger. L'indol donne une coloration orange clair, tandis que le scatol donne une coloration bleue violette soluble dans le chloroforme. La coloration orange, produite par l'indol, est insoluble dans le chloroforme.

La sensibilité pour l'indol et le scatol est environ 1.3000.000. La chaleur facilite la réaction.

II. — Étude du réactif d'Ehrlich à la Diméthylparaminobenzaldéhyde.

En 1901, EHRLICH recommande comme réactif de l'indol la diméthylparaminobenzaldéhyde en solution à 5 % dans l'alcool à 95°.

Si, à 5 cm³ d'une solution alcoolique ou hydro-alcoolique d'indol, on ajoute 0 cm³ 3 à 0 cm³ 5 d'une solution de diméthylparaminobenzaldéhyde et environ 3 cm³ d'HCl pur, il se développe une coloration rouge violet d'intensité variable, suivant la quantité d'indol en solution.

BÖHME (1905) et CROSSONINI (1910) emploient le réactif d'EHRLICH de la manière suivante :

A 5 cm ³ du réactif ainsi composé	{	Dimethylpara.....	4 parties.
		Alcool à 95°.....	380 —
		HCl pur	80 —

On ajoute 5 à 10 cm³ de bouillon, puis on verse dans le mélange 5 cm³ d'une solution saturée de persulfate de potassium.

HERVIEUX (1908) montre la nécessité de séparer l'indol du milieu dans lequel on veut le rechercher, si ce dernier est susceptible de renfermer de l'albumine ou des chromogènes indoxyliques.

L'auteur déclare que l'albumine du sang ou la caséine donnent une coloration bleue ou rouge qui peut gêner la perception de la couleur rouge attribuable à l'indol.

Les chromogènes indoxyliques sont décomposés par l'HCl concentré d'où formation de couleurs indigotiques bleues ou rouges violacées qui sont également susceptibles de nuire à la netteté de la réaction.

PORCHER et PANISSET (1910) mettent également en garde contre la pratique de la réaction effectuée directement sur l'eau peptonée. En effet, les noyaux tryptophaniques contenus dans les matières albuminoïdes et à partir desquels les germes produisent de l'indol donnent eux-mêmes des réactions colorées violettes avec le réactif d'ERLICH.

Louis GAUTHIER (1912) considère la réaction d'EHRlich comme étant le meilleur procédé connu pour déceler la présence de l'indol, mais de nombreux essais conduisent à penser que l'utilisation du persulfate de K n'est pas d'une réelle importance. GAUTHIER s'exprime ainsi : « Des divers essais que nous avons faits, nous croyons pouvoir conclure que la réaction d'EHRlich, modifiée par l'addition de persulfate ou effectuée à chaud, donne une coloration plus foncée que si elle est faite à froid, sans addition d'oxydant, mais cette réaction est suffisamment sensible pour qu'il ne soit pas indiqué d'en augmenter encore la sensibilité par les procédés mentionnés, d'autant plus que les nouvelles teintes obtenues dans ces conditions varient notablement avec la température à laquelle on a porté la liqueur. »

GAUTHIER recommande d'employer : 0 cm³ 26 de réactif (1) et 0 cm³ 4 d'acide chlorhydrique par centimètre cube de solution indolique.

BERTHELOT (1914) utilise la technique suivante pour la recherche de l'indol dans des cultures de *Proteus Vulgaris* (2) :

« 1^o Opérer sur 10 à 15 cm³ de culture; prendre la réaction de celle-ci au papier de tournesol et, si besoin est, l'additionner de quelques gouttes de lessive de soude pour l'alcaliniser franchement.

« 2^o Ajouter à la culture contenue dans un tube à essai son volume d'éther purifié spécialement (3); agiter doucement pendant quelques minutes, puis laisser déposer jusqu'à ce que la couche étherée soit bien limpide, au moins dans la moitié supérieure de sa hauteur — dans le cas d'une émulsion par trop stable, disloquer celle-ci par addition de quelques gouttes d'alcool.

« 3^o Avec un tube à effilure courte dont on se sert à la manière d'un tâtevin, prélever en s'y reprenant à plusieurs reprises, quelques centimètres de la solution étherée, en prenant bien garde de n'entraîner aucune gouttelette du milieu de culture.

« 4^o Aux 3 ou 4 cent. cubes d'éther ainsi recueillis dans un tube à essai, ajouter le quart de leur volume d'une solution de diméthylaminobenzaldéhyde à 4 %, dans l'alcool à 96 degrés; agiter pour bien mélanger les deux liqueurs.

« 5^o A l'aide d'un tube effilé faire arriver lentement au fond du tube renfermant le mélange solution étherée + réactif, 2 ou 3 cent. cubes d'acide chlorhydrique. Laisser reposer cinq minutes; examiner alors le tube devant un fond blanc. La présence d'indol dans la culture examinée

(1) Solution alcoolique de diméthylparaminobenzaldéhyde à 5 %.

(2) Les germes sont cultivées sur milieu synthétique.

(3) L'auteur lave l'éther avec le tiers de son volume d'une solution de soude à 5 %, puis à deux reprises avec de l'eau distillée.

est caractérisée par l'apparition d'un anneau rouge légèrement violacé dans la zone du contact des deux liqueurs; lorsque la proportion d'indol est assez forte, la coloration s'étend à toute la couche inférieure. Une teinte plus violacée, une tendance vers le bleu, s'accusant avec le temps est l'indice de la présence de scatol ou tout au moins d'un mélange de ce corps avec l'indol; bien entendu, dans ce cas, on ne doit pas s'en tenir à cette simple coloration et il faut utiliser des réactions différentielles plus nettes, qui sont fort bien exposées dans la thèse d'HERVIEUX ».

A. MANDOUL et E. GRUAT (1915), visant à la recherche pratique et facile de l'indol, préconisent la technique suivante :

« Epuiser la culture par l'éther, décantier l'éther surnageant et y ajouter quelques gouttes de solution alcoolique à 1/50^e de diméthylparaminobenzaldéhyde.

« L'addition d'une à deux gouttes d'HCl fait apparaître un anneau rouge violet intense en présence de l'indol ».

ZOLLER (1920), étudiant les diverses réactions de l'indol, abandonne, après essais, la réaction d'ERLICH pour les raisons suivantes :

A. Elle donne (la réaction d'ERLICH) une coloration rouge avec les composés phénoliques.

B. Elle est extrêmement lente à atteindre son équilibre quant à sa parfaite et totale intensité de coloration.

C. Elle emploie un produit difficile à obtenir et coûteux. Le réactif se détériore rapidement.

FELLERS et CLOUGH (1925) étudient comparativement les diverses réactions de l'indol; ils accordent leur préférence à la réaction d'EHRlich à la condition de procéder à l'entraînement de l'indol par la vapeur d'eau.

Des facilités d'exécution (absence de mousse) et ce fait que l'ébullition de la culture risque de faire prendre naissance à des corps susceptibles de colorer le réactif ont amené les auteurs à adopter l'entraînement à la vapeur.

Ils font passer un courant de vapeur à travers le contenu d'un tube de culture et récoltent 100 cm³ de distillat. Le distillat est acidifié par 2 cm³ d'acide chlorhydrique concentré et l'indol est extrait en une fois avec 50 cm³ d'éther éthylique, dans une ampoule à décantation de 300 cm³. On sépare la couche d'éther, on lave cet extrait éthéré avec 5 cm³ d'NaOH à 2,5 % puis avec 5 cm³ d'HCl dilué; ces lavages paraissent déplacer les phénols et autres substances nuisibles à la réaction.

On ajoute 10 cm³ d'eau à l'extrait éthéré et on évapore avec soin sur un bain d'eau. Le résidu aqueux est divisé en deux portions de 5 cm³ pour procéder à la recherche de l'indol de la façon suivante :

Ajouter à une portion de 5 cm³ dans un petit tube (1) 0 cm³ 5 de diméthylparaminobenzaldéhyde à 2 % (2), puis 1 cm³ d'HCl (3). Placer le tube pendant 20 secondes dans l'eau bouillante, agiter vigoureusement et extraire le colorant avec 1 cm³ de chloroforme.

Comparer la couleur rouge obtenue avec celle des témoins d'indol préparés exactement de la même manière.

Cette réaction est sensible à 1:25.000.000.

FELLERS et CLOUGH considèrent la réaction d'EHRlich comme étant la plus sensible, la plus sûre et la plus simple, à condition qu'il s'agisse de doser l'indol non mélangé à du scatol.

Quand les deux corps se trouvent ensemble, la gradation des couleurs obtenues par le réactif va du rouge au violet, selon les quantités respectives en présence.

Les auteurs font remarquer que la durée du temps de distillation a une influence insignifiante sur le pourcentage d'indol trouvé dans le distillat.

L'acide indol-acétique et autres substances, souvent pré-

(1) En verre blanc.

(2) Solution à 2 % dans l'alcool à 95°.

(3) Acide chlorhydrique dilué (HCl concentré 600 mc³ + H²O distillée 200 cm³).

sentes dans les cultures bactériennes, n'affectent pas sérieusement la réaction réalisée dans les conditions indiquées ci-dessus.

En ce qui concerne l'évaporation de l'extrait éthéré sur un couche d'eau, comme nous l'avons expliqué ci-dessus, les auteurs recommandent de chauffer doucement jusqu'à évaporation de la plus grande partie de l'éther, puis d'enlever les dernières portions par aspiration.

III. — Étude du réactif de Legal au Nitroprussiate de soude.

La technique préconisée par LEGAL pour déceler l'acétone dans une solution, en la traitant successivement par le nitro-prussiate de soude, la soude caustique et l'acide acétique, a été appliquée pour la première fois en 1892 par BELA DE BITO à la recherche de l'indol.

En 1908, DENIGÈS recommande la technique suivante :

« Ajouter 1 goutte de solution à 5 % de nitroprussiate de soude par centimètre cube de liquide indolique et autant de gouttes de lessive de soude que de gouttes de nitroprussiate. Additionner ensuite d'un grand excès d'acide acétique jusqu'à obtention d'une coloration bleue intense ».

On arriverait ainsi à déceler 1 milligramme d'indol dissous dans un litre d'eau.

Les corps suivants tels que le tryptophane, le nitroso-indol, le scatol, l'acide sulfhydrique, les monophénols ne seraient pas sensibles à ce réactif.

WALTHER FRIEBER (1921) spécifie que le réactif de LEGAL ne donne pas de coloration avec l'acide indol-acétique. On obtiendrait la coloration bleue classique avec le noyau libre de l'indol seulement.

FELLERS et CLOUGH (1925) rejettent la réaction au nitro-prussiate de soude, lui reprochant surtout de manquer de sensibilité.

D'après DENIGÈS (*Précis de chimie analytique*, page 172), « la réaction de LEGAL est une réaction caractéristique du groupe CH_2CO , à condition que la valence du carbonyle soit saturée par de l'hydrogène ou par un radical hydrocarboné gras ou aromatique. La coloration obtenue est rouge quand ce radical appartient à la série grasse, bleue quand il provient de la série cyclique ».

Par exemple, l'hypnone ou acétophénone qui, comme le montre la formule ci-dessous, a une valence de carbonyle saturée par un radical hydrocarboné aromatique, donne une coloration bleu intense par le réactif de LEGAL.



On oppose généralement à l'emploi du réactif de LEGAL pour la recherche de l'indol le fait qu'il est utilisé pour déceler l'acétone. Nous ferons remarquer que la coloration obtenue avec l'indol est bleue et que celle obtenue avec l'acétone est rouge. De plus, il faut la présence de quantités assez importantes d'acétone pour masquer la réaction de l'indol. Pour fixer un chiffre, nous dirons en effet qu'il est possible de déceler avec sûreté 0 gr. 03 % d'indol dans un tube de culture de 10 cm^3 additionné de 3 % d'acétone. Nous ne pensons pas qu'il se puisse jamais trouver d'acétone à pareille dose dans une culture microbienne en eau peptonée.

Il ne nous semble donc pas que l'on puisse faire grief à la réaction de LEGAL employée pour l'indol de ce fait qu'elle est un réactif classique de l'acétone.

Malheureusement, sa sensibilité est moindre que celle du réactif d'EHRlich ou de DENIGÈS. Nous estimons qu'en pratiquant la réaction directement sur le milieu de culture (eau peptonée) on ne peut plus déceler la présence d'indol au-dessous d'une concentration de 0 gr. 01 d'indol pour 1.000.

IV. — Étude de la réaction au nitrite de soude et acide sulfurique (réaction de Salkowski).

Si l'on ajoute à une culture microbienne contenant de l'indol quelques gouttes d'une solution de nitrite de soude à 1 p. 1.000 et quelques gouttes d'acide sulfurique pur, on observe une coloration rouge vif.

Dès 1870, BAEYER signale la propriété que possèdent les solutions aqueuses d'indol de se colorer en rouge par addition d'acide nitreux. SALKOWSKI, en 1884, remarque également cette même propriété et c'est KITASATO, en 1889, qui, le premier, applique cette réaction à la recherche de l'indol dans les cultures microbiennes. MACÉ (1912), dans son *Traité pratique de bactériologie*, donne la technique de KITASATO :

« A 10 ou 20 cm³ environ de bouillon de culture que l'on veut essayer, on ajoute 1 ou 2 cm³ de solution de nitrite de potassium à 1 p. 1.000 puis on traite par quelques gouttes (8 à 10) d'acide sulfurique pur. S'il y a de l'indol, la coloration apparaît. On peut employer l'acide chlorhydrique au lieu d'acide sulfurique. La coloration peut être très légère et masquée plus ou moins complètement par la nuance du bouillon. En ajoutant 1 ou 2 cm³ d'alcool amylique pur et en remuant doucement pour ne pas faire d'émulsion, on provoque la concentration de la matière rouge dans l'alcool amylique qui se teint alors en rose plus ou moins foncé ».

NONOTTE et DEMANCHE (1908) ont appliqué la méthode de SALKOWSKI et ils recommandent la technique suivante pour la réaliser :

« A une culture dans 20 cm³ d'eau peptonée à 2% (peptone Byla) additionnée de 5 p. 1000 de chlorure de sodium et neutralisée, ajouter 1 cm³ d'une solution de nitrate de potasse à 1 p. 1000 et 8 gouttes d'acide sulfurique concentré, puis porter à l'ébullition la partie supérieure du tube de culture ».

Selon NONOTTE et DEMANCHE, le chauffage augmenterait dans de notables proportions la sensibilité de la réaction et permettrait de déceler de l'indol dans des cultures âgées de quatre heures seulement; antérieurement au travail de ces auteurs, les études publiées sur cette question n'ont pu mettre en évidence l'indol avant un délai minimum de 24 heures. NONOTTE et DEMANCHE déclarent avoir pu apprécier des différences de 0 milligr. 005 d'indol et déterminer dans les cultures la teneur en indol à $1/2000.000^e$ près.

ZOLLER (1920) souligne la nécessité de ne pas rechercher l'indol directement sur le milieu de culture avec le réactif de SALKOWSKI. L'auteur remarque que, dans la plupart des méthodes indiquées pour la séparation de l'indol des milieux biologiques, on préconise l'addition d'un acide ou d'une base de forte concentration. ZOLLER déclare que la raison d'un tel traitement est assurément de prévenir la volatilisation de certaines substances gênantes en les neutralisant *in situ*.

Puisque, dit l'auteur, l'indol est une imine aromatique possédant des propriétés basiques, nous pouvons nous attendre à former des composés avec les acides forts. En effet, on a isolé le nitrate et le chlorure de nitroso-indol.

Les méthodes d'isolement et les propriétés de ces corps permettent de penser que ces composés sont très lâchement associés. De fait, l'indol peut être déplacé d'une solution d'acide fort par entraînement par la vapeur d'eau.

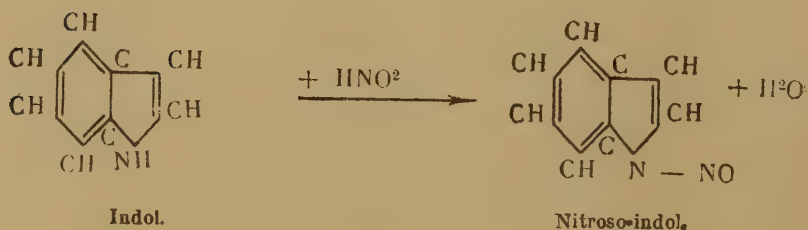
Pour l'auteur, l'indol possédant des propriétés basiques faibles doit se volatiliser plus librement d'une solution alcaline que d'une solution acide. Il restait à déterminer quelle est la concentration en ions H^+ à laquelle l'indol peut être volatilisé le plus rapidement sans toutefois que sa molécule se trouve attaquée.

Après de nombreux essais, ZOLLER s'arrête au chiffre de pH : 9,2 auquel il amène ses solutions, avant de pra-

tiquer la distillation. L'auteur a trouvé que, dans les limites de pH = 8,5 à 10,5, si l'on part de 100 cm³ de solution indolique, tout l'indol avait intégralement passé dans les 75 premiers centimètres cubes.

Le point de pH = 9,2 fut arbitrairement choisi; c'était le point qui offrait le maximum de garanties en ce qui concerne l'élimination des causes d'erreur provenant de corps autres que l'indol. La réaction de SALKOWSKI (NaNO² à 1% + SO⁴H²) est pratiquée par ZOLLER sur le distillat et le corps coloré est extrait par l'alcool isobutylique ou isoamylique.

L'auteur prétend qu'avec un certain entraînement on peut apprécier 0 milligr. 02 d'indol. Il recommande les proportions suivantes : pour 10 cm³ de liqueur indolique, 2 gouttes d'une solution de nitrite de Na à 1% + 5 gouttes SO⁴H² concentré. Vu l'homogénéité et la constance de ses résultats, ZOLLER, qui a opéré l'extraction de l'indol par distillation directe, juge superflu l'entraînement à la vapeur d'eau. Il est très probable, dit-il, que la formation du nitroso-indol s'effectue d'après le schéma suivant :



Le nitroso-indol est facilement soluble dans l'alcool méthylique et peut être cristallisé à partir de ce solvant.

Le nitroso-indol cristallisé en lamelles brillantes de couleur chair. Ses cristaux semblent pouvoir se conserver

longtemps sans altérations. Ils pourraient servir, après purification, à préparer des solutions types.

WALTHER FRIEBER (1921) met en garde contre l'emploi de la réaction de SALKOWSKI (1) qu'il accuse d'être la cause de nombreux malentendus. En effet, au cours de l'attaque du tryptophane par les Bactéries, pour aboutir à la formation de l'indol, il y a passage par le stade acide indol-acétique. Or, si les germes producteurs d'indol vont jusqu'au stade indol, les germes non indologènes s'arrêteraient, eux, au stade acide indol-acétique qui, par la réaction de SALKOWSKI, donne une coloration rouge.

D'après WALTER FRIEBER, cette réaction ne devrait pas avoir la place importante qu'elle a dans les manuels de microbiologie en tant que réaction caractéristique de l'indol.

En 1923, le *Committee on Bacteriological Technic of the Society of American Bacteriologists* donne la technique suivante de la réaction de SALKOWSKI :

« Mélanger 5 cc. de la culture avec environ un tiers de son volume de 1 : 1 acide sulfurique. Verser en surface une petite quantité d'une solution de nitrite de soude à 0,02%.

« Une réaction positive est indiquée par une zone colorée en rose, entre la solution indolique acidifiée et la solution de nitrite de soude ».

En 1925, FELLERS et CLOUGH indiquent la nécessité de pratiquer la réaction de SALKOWSKI sur le distillat, à cause de substances intervenant, telles que l'acide indol-acétique ou indol-propionique, l'ammoniaque, les alcools, aldéhydes et autres produits du métabolisme qui peuvent être présents dans les cultures bactériennes.

L'acide indol-acétique et l'acide indol-propionique donnent une réaction colorée semblable à celle donnée par l'indol, mais, puisqu'ils sont seulement très peu entraî-

(1) L'acide indol-acétique donne une réaction positive avec le réactif de SALKOWSKI.

nables par la vapeur d'eau, ils ne passent dans le distillat qu'en proportions insignifiantes.

Nous venons de voir que la plupart des réactifs employés pour la mise en évidence de l'indol ne réagissaient pas uniquement en la seule présence de ce corps.

Nous donnons, dans le tableau suivant, un résumé de l'étude, au point de vue de leur électivité à l'égard de différents corps, des réactifs de DENIGÈS, ERHLICH, LEGAL et SALKOWSKI.

Ce tableau contient les résultats positifs ou négatifs que nous avons obtenus en appliquant la réaction de l'indol aux corps suivants : Indol, Tryptophane, Tyrosine, Phénol, Acide sulfhydrique. Pour le scatol, dont nous n'avons pu nous procurer d'échantillon, nous avons rapporté les résultats habituellement admis par les auteurs.

Réactifs de :	Indol	Scatol	Tryptophane	Tyrosine	Phénol	Acide sulfhydrique
DENIGÈS	+	+	+	—	—	—
ERHLICH.	+	(colorat bleu)	+	—	+	—
LEGAL.....	+	(col. violette)	—	—	—	— (2)
SALKOWSKI ...	+	—	+	—	+	— (4)
		(color. jaune)				

(1) Apparition d'un anneau jaune de chrome clair.

Un anneau jaune, moins intense il est vrai, se forme toujours dans le tube témoin.

(2) Par addition de soude, on obtient une coloration rouge groseille intense. Il y a décoloration par addition d'acide acétique; il reste finalement une teinte jaune vert sale.

(3) On obtient une coloration jaune vieil or.

(4) Opalescence laiteuse.

N. B. — Pour le tryptophane, les essais ont été faits avec une solution à 0 gr. 20 %. Avec la vanilline, on obtient une faible teinte jaune. Avec la diméthylparaminobenzaldéhyde, on obtient une légère teinte rose. Avec le nitrite de soude et l'acide chlorhydrique, on obtient une teinte jaune d'or.

Pour chacune des réactions, un témoin a été fait (eau distillée + réactif).

CHAPITRE III

RECHERCHE DE L'INDOL DANS LES CULTURES BACTÉRIENNES

Les réactions dont nous venons de donner les techniques peuvent s'effectuer de deux manières différentes : ou bien on les réalise directement sur la culture elle-même, ou bien on extrait préalablement l'indol du milieu de culture, par un procédé quelconque. La réaction est alors effectuée au sein du solvant qui a servi à l'extraction de l'indol.

D'une façon générale, cette seconde manière d'opérer est préférable à la première. En effet, nombreux sont les corps contenus dans le milieu de culture employé qui sont susceptibles d'influencer les réactifs utilisés. D'après LEHMANN et NEUMANN, la putréfaction des peptones donne naissance à la série de corps suivants : albumoses, ammoniacque, amines, leucine, tyrosine, acides gras oxydés, indol, scatol, phénol, acide sulfhydrique, mercaptans, acide carbonique, hydrogène et éventuellement méthane. Or, nous avons vu que plusieurs des corps ci-dessus peuvent fournir des réactions colorées avec les réactifs utilisés; il est donc nécessaire d'éliminer ces substances susceptibles d'apporter de la confusion dans la détermination de l'indol.

Différents auteurs ont recommandé la distillation du milieu de culture pour réaliser la séparation de l'indol.

D'après PORCHER, si l'on distille un milieu contenant du tryptophane, le noyau tryptophanique donne naissance, entre autres corps, à de l'acide indol-carbonique qui, sous l'action de la chaleur, se dédouble en acide carbonique et

indol. Pour cette unique raison, la distillation directe nous paraît devoir être rejetée d'une manière définitive.

La méthode de recherche de l'indol qui nous semble offrir, actuellement encore, le maximum de garanties, est celle préconisée par Louis GAUTHIER en 1912 et qui consiste à faire un extrait éthéré de la culture, par agitation, puis à distiller cet extrait éthéré. L'indol étant très volatil est entraîné par les vapeurs d'éther qui sont condensées dans un réfrigérant; on recueille finalement une solution éthérée d'indol.

Le procédé de distillation (1) que nous avons adopté, sur les conseils de M. le professeur LASSEUR, est un peu différent. Il consiste à provoquer la distillation de l'éther en faisant arriver un courant de vapeur d'eau dans l'extrait éthéré. Ce procédé présente l'avantage de réaliser la distillation de l'éther à une température relativement basse. D'autre part, le montage de l'appareil permet le traitement successif et facile de plusieurs extraits éthérés.

Avant d'exposer la technique que nous avons suivie pour rechercher l'indol à l'aide du réactif d'EHRlich, nous dirons quelques mots du milieu de culture employé et des précautions à observer dans sa préparation.

Préparation du milieu de culture utilisé pour l'étude de la fonction indologène.

L'eau peptonée est le milieu de culture habituellement employé pour la mise en évidence de la fonction indologène d'un germe. Des erreurs d'interprétation pouvant être dues au fait que les peptones renferment parfois de petites quantités d'indol, il faut songer à éliminer cet indol avant d'utiliser l'eau peptonée comme milieu de culture.

SICRE (1909) a déclaré que la plupart des peptones com-

(1) Voir page 26 (réalisation de la réaction).

merciales renfermaient des traces d'indol susceptibles de donner une réaction avec le réactif d'EHRlich. D'après PORCHER « la quantité d'indol trouvée dans une peptone est toujours extrêmement faible, elle est de l'ordre d'une fraction de $1/10^e$ de milligramme pour 50 grammes de peptone ». Dans ces conditions, si on opère la recherche de l'indol sur une grosse quantité de culture et si l'on concentre, avant d'effectuer la réaction, l'indol présent dans la peptone peut devenir une source d'erreur. Naturellement, si la recherche de l'indol doit simplement porter sur le contenu d'un tube de culture, la présence de 0 milligr. 1 dans 50 gr. de peptone n'a plus aucune importance. De toute manière, si on veut éliminer l'indol présent dans une peptone, il suffit, lors de la préparation de la solution de peptone, de la faire bouillir à gros bouillons pendant 5 minutes; on libère ainsi le milieu de culture des traces d'indol qu'il pourrait renfermer.

Il faut, avant de préparer le milieu de culture, s'assurer que la peptone employée est bien une peptone pancréatique à noyau tryptophanique. Il faut donc vérifier la présence de tryptophane dans la peptone; dans ce but, nous aurons recours à la réaction indiquée par Pierre THOMAS (*Cours de chimie biologique*, page 179).

La réaction s'effectue de la manière suivante :

« Si on ajoute à 2 cc. du liquide dans lequel on recherche le tryptophane une goutte de solution de formaldéhyde à 2% et 15 cc. d'acide chlorhydrique concentré et si, après dix minutes, on verse dans ce mélange 10 à 12 gouttes de solution de nitrite de soude à 0,05%, on voit se développer rapidement une coloration violette ».

A ce propos, nous nous sommes aperçus, en comparant deux peptones d'origine différente à l'aide de ce réactif, que de ces deux peptones l'une donnait plus d'indol que l'autre, à développement de culture sensiblement égal. Malheureusement, la meilleure était celle qui renfermait du tryptophane en moindre quantité. Il faudrait donc se

garder de dire qu'une peptone convient d'autant mieux à l'étude de la fonction indologène qu'elle est plus riche en tryptophane. On doit faire intervenir d'autres facteurs, soit que certaines peptones renferment des substances nuisant à la formation de l'indol, soit que les germes fussent susceptibles de former de l'indol à partir d'autres corps que le tryptophane.

Nous allons exposer maintenant la technique que nous avons suivie pour rechercher l'indol dans les cultures microbiennes.

Technique de recherche de l'indol utilisée dans notre travail.

Nous employons comme milieu de culture de l'eau peptonée simple à la concentration de 3 % et ajustée à pH 7,8.

La peptone est préalablement soumise à la recherche du tryptophane selon la technique indiquée plus haut (page 25) et la solution peptonée débarrassée de toute trace d'indol par ébullition.

L'eau peptonée obtenue est ensuite répartie en tubes à raison de 10 cm³ d'eau peptonée par tube.

Les cultures utilisées pour la recherche de l'indol sont, à part exception spécifiée, des cultures âgées de 48 heures.

Réalisation de la réaction.

Le contenu d'un tube de culture est versé dans une ampoule à décantation. On extrait l'indol par trois agitations successives avec de l'éther (1); une première fois à volume égal de la culture, une seconde fois avec demi-volume et enfin une troisième fois avec encore un demi-

(1) Comme le signale LOUIS GAUTHIER (Thèse Lyon 1912), il est nécessaire de ne pas employer d'éther impur pour l'extraction de l'indol. En effet, de l'indoxyle prend naissance sous l'action des impuretés de l'éther.

Selon les indications de l'auteur, l'éther sera lavé successivement avec le tiers de son volume d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 %, avec de l'eau distillée, de la potasse à 10 % ensuite, finalement, et à trois ou quatre reprises avec de l'eau distillée.

C'est cet éther ainsi purifié qui nous servira à extraire l'indol des milieux de culture.

volume, soit 20 centimètres cubes d'éther en tout pour 10 centimètres cubes de culture (1).

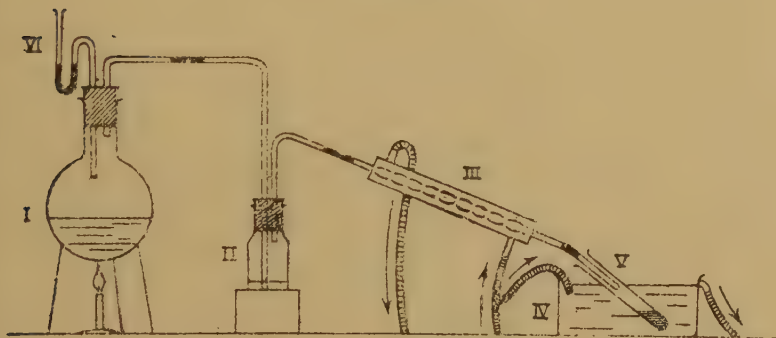
On extrait ainsi d'une culture normalement développée tout l'indol qui s'y trouve.

Après agitation, la séparation des deux liquides se fait le plus souvent mal. On fait alors tomber la mousse formée en la disloquant par addition de quelques gouttes d'alcool.

L'extrait éthéré obtenu est distillé par entraînement à la vapeur d'eau à l'aide de l'appareil figuré ci-dessous.

Certains phénols et particulièrement la plupart des mono-phénols étant solubles dans l'éther et entraînables par la vapeur d'eau, il est bon de les fixer en additionnant l'extrait éthéré d'une petite quantité de soude. Les phénols en effet donnent des réactions colorées avec le réactif p'EHRlich.

MONTAGE DE L'APPAREIL A DISTILLATION DE L'EXTRAIT ÉTHÉRÉ



- I. Générateur de vapeur (verre Pyrex).
- II. Flacon dans lequel on place l'extrait éthéré que la vapeur d'eau venant du générateur fera distiller.
- III. Réfrigérant.
- IV. Cuve à circulation d'eau froide pour refroidissement du tube recevant le distillat éthéré.
- V. Tube dans lequel on reçoit le distillat.
- VI. Tube en S servant de soupape de sûreté au générateur.

(1) La quantité d'éther nécessaire à l'extraction de l'indol est fonction de l'état de développement de la culture. Plus une culture est abondamment développée, plus il faut répéter les extractions.

FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL

Le flacon II étant enlevé, chauffer le générateur de vapeur I et établir le courant d'eau dans le réfrigérant III et la cuve IV.

Prendre la précaution de mettre, une fois pour toutes, quelques fragments de ponce dans le générateur afin d'éviter les soubresauts de l'ébullition.

Lorsque l'eau bout et qu'un jet de vapeur sort à l'extrémité du tube de verre, mettre vivement en place le flacon II contenant l'extrait éthéré. Ce flacon doit avoir un bouchon bien ajusté, qui doit pouvoir être enfoncé rapidement, tout en assurant une fermeture parfaite. On doit veiller à ce que le goulot du flacon soit bien circulaire; on a de même intérêt à employer un bouchon de caoutchouc bien souple. Il va de soi qu'un mauvais bouchage de ce flacon entraîne des pertes appréciables d'indol; dans le but d'éviter ces pertes, il faut vérifier la parfaite étanchéité de l'appareil.

On laisse distiller tant qu'il passe de l'éther; il faut même continuer la distillation pendant quelques instants jusqu'à ce qu'il y ait, dans le tube V, quelques centimètres cubes d'eau en dessous de la couche éthérée. On peut alors être assuré qu'il ne reste sensiblement plus d'indol dans l'appareil. Le distillat recueilli contient intégralement tout l'indol et l'appareil peut servir à un nouvel entraînement à la vapeur; on a la certitude de ne plus trouver d'indol provenant de l'opération précédente.

L'éther distillé et recueilli dans le tube V sert, après concentration, pour effectuer la recherche de l'indol.

TRAITEMENT DU DISTILLAT

Le tube V contient donc de l'indol en solution éthérée, saturée d'eau. Il y a de plus quelques centimètres cubes d'eau dans le fond du tube.

Recueillir la solution éthérée, puis laver le résidu aqueux avec quelques centimètres cubes d'éther, afin d'extraire les traces d'indol qu'il peut contenir. Réunir les deux solutions éthérées, les concentrer, avant de procéder à la recherche de l'indol.

CONCENTRATION DU DISTILLAT ÉTHÉRÉ

La concentration doit être effectuée lentement à la température la plus basse possible.

On peut opérer sur un bain-marie à feu très doux.

TECHNIQUE POUR LA RÉACTION D'EHRLICH

La technique que nous donnons ci-joint est celle donnée par Louis GAUTHIER (1912). Cette technique permet de déceler de très faibles traces d'indol.

« Dans un tube à essai, on ajoute une petite quantité du réactif à la liqueur dans laquelle on soupçonne la présence d'indol puis, à l'aide d'une pipette effilée, on fait arriver, à la partie inférieure, de l'acide chlorhydrique pur. A la surface de séparation, s'il y a de l'indol, on voit se former un mince anneau coloré, anneau qui s'épaissit si l'on agite légèrement. Il est bon d'observer sur un fond blanc. »

La méthode que nous venons d'indiquer permet de déceler des quantités très minimes d'indol dans un milieu de culture. Elle peut également, avec quelques variantes, être adaptée à la recherche quantitative de l'indol.

Méthode de Louis Gauthier pour le dosage de l'indol sur le distillat éthéré d'une culture.

« Employer quatre burettes placées côte à côte.

« La première B 1 contient la solution étalon, obtenue en versant dans un volume déterminé d'éther un volume également déterminé de solution alcoolique d'indol, bien

titrée. Il est préférable d'employer une solution très étendue.

« La deuxième B 2 contient la solution étherée dans laquelle on doit doser l'indol.

La troisième B 3 contient de l'éther lavé à l'acide sulfurique et à la potasse.

« La quatrième B 4 contient le réactif ainsi composé :

Solution alcoolique de Diméthylparaminobenzal-

déhyde à 5 %	1 partie.
Alcool à 95°	3 parties.
Acide chlorhydrique	2 parties.

« Dans un tube, on fait couler 5 cc. du liquide étalon et 6 cc. du réactif. On refroidit sous un filet d'eau et on agite légèrement. On opère de même avec un autre tube, en remplaçant la solution étalon par la solution à analyser B 2 de titre X. Si la teinte obtenue est plus foncée que la première, on verse dans un tube 2 cc 5 du liquide B 2 et 2 cc à 5 cc d'éther puis 6 cc. de réactif. Si la teinte obtenue est toujours plus foncée, on mettra 1 cc 5 de B 2, 3 cc 75 d'éther et 6 cc de réactif. Si elle est encore plus foncée, on dilue la solution B 2 au 1/8^e en prenant une partie de cette solution et 7 parties d'éther et on continue les opérations comme nous venons de l'indiquer. Si, au contraire, la liqueur étalon était plus concentrée que le liquide à analyser, on ferait subir les diverses dilutions au liquide étalon.

« Quand on arrive à des teintes à peu près identiques, on recommence la réaction avec les deux liquides et on porte sous le colorimètre. Il est nécessaire de recommencer les opérations immédiatement avant de porter sous le colorimètre, parce que, après une exposition à la lumière d'une durée assez courte, la coloration peut changer ».

CONSERVATION DES SOLUTIONS TITRÉES D'INDOL

Les solutions alcooliques d'indol se conservent bien. Les solutions titrées d'indol devront donc être alcooliques

et, de plus, conservées dans des flacons en verre jaune soigneusement bouchés. Après chaque prélèvement dans la solution, il est recommandé de paraffiner le bouchon.

Nous avons conservé ainsi en flacon de verre jaune et dans une armoire obscure une solution alcoolique d'indol à 0,20 %. Quatre mois plus tard, le titre de la solution n'avait pas changé.

CHAPITRE IV

RECHERCHE DE L'INDOL DANS LES CULTURES DE DIVERSES ESPÈCES MICROBIENNES

Nous avons effectué la recherche de l'indol dans les cultures d'un certain nombre de germes.

Nous donnons, dans le tableau suivant, les résultats que nous avons obtenus.

Les réactions d'identification de l'indol ont été effectuées sur le distillat éthéré, suivant la méthode indiquée, page 26, exception faite pour les germes marqués d'une astérisque.

Pour ces derniers, cultivés sur milieu synthétique (1), les réactions ont été effectuées directement sur le milieu de culture, suivant les techniques indiquées précédemment (2).

Les réactions ont été faites au bout de 48 heures pour les germes poussant à l'étude à 37° C.; au bout de quatre jours pour les germes dont les conditions optima de température varient de 15° à 20° C. Pour ces derniers germes, des réactions de l'indol furent également pratiquées sur des cultures âgées de 12 jours.

(1) Milieu synthétique (Voir 2^e partie, p. 123).

(2) Les techniques employées furent :

a) Pour la réaction à la vanilline, la technique de DENIGÈS décrite à la page 8.

b) Pour la réaction au nitroprussiate de soude, la technique de DENIGÈS décrite à la page 16.

c) Pour la réaction au nitrite de soude, la technique de KITASATO décrite à la page 18.

Production de l'indol par diverses espèces microbiennes

Désignation des espèces
microbiennes

Recherche de
l'Indol.

COCCI

<i>Sarcina aurantiaca</i> FLÜGGE 1886 (Institut PASTEUR)	négative.
<i>Sarcina flava</i> DE BARY 1887 (I. P.) (1).....	négative.
<i>Sarcina lutea</i> SCHROBER 1886 (I. P.).....	négative.
<i>Staphylococcus aureus</i> , ROSENBAACH 1884 (I. P.).....	négative.
<i>Streptococcus MITTER</i> (I. P.).....	négative.
<i>Tetragena TREMOLL</i> (I. P.).....	négative.

BACTÉRIES

* <i>B. ruber Balticus</i> KRUSE 1888 (collection LASSEUR).....	négative.
<i>B. Coli communis</i> ESCHERICH 1886 (I. P.).....	positive.
* Bacille rouge d'Essey (coll. LASS.) (2)	négative.
<i>B. coli mutabile</i> (coll. LASS.)	négative.
<i>B. typhi</i> EBERTH-GAFFKY 1884 (I. P.).....	négative.
<i>B. paratyphosus</i> B. SCHOTMÜLLER 1900 (I. P.).....	négative.
<i>B. paratyphosus</i> A. BRION et KAYSER 1902 (I. P.).....	négative.
<i>B. lactis aerogenes</i> ESCHERICH 1886 (I. P.)	négative.
* <i>B. prodigiosus</i> EHRENBURG 1839, FLÜGGE 1886, normal et race blanche (coll. LASS.)	négative.
* <i>B. megatherium</i> DE BARY 1884 :	
a) Souche CALMETTE (coll. LASS.).....	négative.
b) Souche FISCHER (coll. LASS.)	négative.
* <i>B. mesentericus</i> FLÜGGE 1886 :	
a) Souche FRAENKEN (coll. LASS.).....	négative.
b) Souche LAHMENN (coll. LASS.).....	négative.
* <i>B. mesentericus ruber</i> GLOBIG 1888 (coll. LASS.)	négative.
<i>B. pyocyaneus</i> GESSARD 1882 (I. P.).....	négative.
<i>B. subtilis</i> (EHRENBURG) COHN (I. P.).....	négative.
<i>Proteus</i> X 19 (I. P.)	positive.
<i>Proteus</i> HX 19 (I. P.).....	positive.
<i>Proteus</i> X 2H (I. P.).....	positive.
<i>Proteus</i> OX 19 (I. P.).....	positive.
<i>Proteus</i> X 19 Syrie (I. P.).....	positive.
<i>Proteus</i> V (I. P.).....	positive.
Vibron du choléra POT (I. P.)	positive.
Vibron FINCKLER et PRIOR (I. P.).....	positive.

(1) Institut PASTEUR.

(2) Collection LASSEUR.

BACILLES FLUORESCENTS	Désignation des espèces microbiennes	Recherche de l'indol
	<i>B. caryocyaneus</i> BEIJERINK-DUPAIX 1930 (coll. LASS.) ...	négative.
	* <i>B. cyaneo-fluorescens</i> ZANGEMEISTER 1895 :	
	a) Type achromogène (coll. LASS.)	négative.
	b) Type normal (coll. LASS.)	négative.
	<i>B. fluorescens albus</i> ZIMMERMANN 1890 (National collection of type culture London)	négative.
	<i>B. fluorescens aureus</i> ZIMMERMANN 1890 (Nat. coll. London) (1)	négative.
	Bacille fluorescent liquéfiant HIRBQUELLWASSER (<i>in litt.</i>) (Nat. coll. London)	négative.
	Bacille fluorescent du <i>mucus nasal</i> . JAISER (<i>in litt.</i>) (Nat. coll. London)	négative.
	<i>B. fluorescens putidus</i> FLÜGGE 1886 (<i>in litt.</i>) (Nat. coll. London)	positive.
	Bacille fluorescent pathogène pour les plantes ZACH. (<i>in litt.</i>) (Nat. coll. London)	positive.

(1) National collection of type culture London.

Valeur de la fonction indologène au point de vue systématique

La propriété que possèdent certains germes de former de l'indol aux dépens des milieux de culture contenant un noyau tryptophanique, peut-elle être utilisée dans un but de classification? Peut-elle être considérée à l'égal des caractères d'identification couramment utilisés, tels que la production de gaz, de pigments, etc.? Cela conduit à considérer la constance de la fonction indologène d'une espèce microbienne déterminée.

Voici, à ce sujet, l'opinion de quelques auteurs :

En 1892, PÉRÉ cultive le Colibacille en eau peptonée sucrée. On sait que, dans ces conditions, le Colibacille ne produit pas d'indol. On pourrait supposer qu'en entraînant le germe à vivre sur un tel milieu, on aboutirait à faire disparaître sa propriété indologène. L'auteur constate que l'entretien même prolongé ne provoque pas d'atténuation de la fonction indologène et que le Colibacille transporté de nouveau dans une solution de peptone pure y fait de l'indol comme le microbe originel.

En 1915, MANDOU et GRUAT, étudiant la fonction indologène à l'aide du réactif d'EHRlich, font les déclarations suivantes : « Notre pratique actuelle nous fait attacher une grande valeur à cette recherche (1). Ce caractère ne s'altère pas par suite des repiquages successifs que subissent les germes pour être conservés. Nous sommes donc là en présence d'un caractère d'espèce des plus fixes qu'il nous ait été donné de trouver en bactériologie ».

ZUBER (1919) dit à propos du Colibacille qu'il faut « également faire justice de ce fait que le Colibacille peut, après plusieurs générations, perdre sa propriété indologène ». ZUBER constate à la suite de réensemencements successifs sur un même milieu peptoné des réactions de l'indol

(1) La production d'indol.

de moins en moins fortes, mais « ce même Colibacille dont la fonction indologène s'était passablement atténuée à la dixième génération, nous a donné par réensemencement sur bouillon simple une réaction d'indol des plus caractéristiques.

« Il est donc normal de considérer la fonction indologène des Bactéries comme un de leurs caractères absolument spécifique, à la condition qu'elle soit, comme il convient pour toute expérience biologique, toujours recherchée dans les mêmes conditions ».

En 1921, WALTHER FRIEBER estime que la valeur de la réaction de l'indol est l'égale de celles des autres méthodes utilisées dans la détermination d'un germe (production de gaz, d'acide, coloration de GRAM, etc...).

En 1931, FRICKER et LAURIN étudient l'action du Coliphage sur la production de l'indol par le Colibacille. Les cultures sont additionnées, après ensemencement, d'une goutte de Coliphage très actif. Les auteurs sont amenés à conclure que « le bactériophage paraît susceptible, dans des conditions déterminées, de modifier le pouvoir indologène du Colibacille. Cette modification est d'ailleurs passagère et disparaît au cours des repiquages ultérieurs ».

Pour notre part, les différentes espèces dites indologènes que nous avons étudiées nous ont toujours fidèlement donné une réaction de l'indol positive; nous avons observé la même constance dans les résultats, en ce qui concerne les germes non producteurs d'indol, fournissant une réaction de l'indol négative.

Pour conclure, nous considérerons que, faite dans des conditions toujours rigoureusement identiques, la recherche de l'indol dans une culture microbienne constitue un caractère d'égale valeur à ceux couramment employés (Production de gaz, virage de colorants, production de pigment, etc...).

DEUXIÈME PARTIE

Remarques sur la biologie du Colibacille et sa fonction indologène.

L'étude de la fonction indologène nous a tout naturellement conduit à nous intéresser au Colibacille. En effet, de par son importance en hydrologie, c'est dans les cultures de ce germe que la recherche de l'indol est le plus souvent effectuée en bactériologie. On sait que le Colibacille est une Bactérie indologène et que cette fonction constitue un des caractères servant à la détermination du germe. La présence du *B. coli communis*, sa longévité dans les eaux, sa fonction indologène, le comportement de cette fonction dans certaines circonstances, telles sont les principales questions dont nous nous sommes occupés et dont l'exposé fera l'objet de la seconde partie de notre travail. Nous allons donner tout d'abord la méthode préconisée par l'illustre biologiste VINCENT pour la recherche du Colibacille dans les eaux.

CHAPITRE I

MÉTHODE EMPLOYÉE POUR L'OBTENTION D'UNE SOUCHE DE COLIBACILLES

Nous avons employé, pour l'isolement des Colibacilles, la méthode classique de VINCENT. Ce savant utilise l'action combinée de la chaleur et de l'acide phénique. Le Colibacille résiste, en effet, à une concentration en acide phénique mortelle pour la plupart des germes; de plus, il se développe relativement plus vite à la température de 41°,5 C.

La méthode de VINCENT donnée pour la recherche du Colibacille dans les eaux est la suivante :

I) On ensemence des quantités croissantes d'eau :

a) Dans 5 tubes, on verse 10 cm³ d'eau peptonée à 1 % et salée à 0,5 %, à chacun des tubes; on ajoute l'eau en expertise, à dose respective de 0 cm³ 05, 0 cm³ 10, 0 cm³ 25, 0 cm³ 50, 1 cm³.

b) Dans deux autres tubes, renfermant 20 cm³ d'eau peptonée salée, on ensemence respectivement 2 cm³ et 5 cm³.

c) Dans 5 ballons, on distribue 10, 20, 50, 100 et 200 cm³ de l'eau à analyser.

On ajoute des quantités convenables de la solution suivante (1) :

Peptone.....	50 gr.
Sel marin	25 gr.
Eau.....	100 gr.

(1) Cette solution est stérilisée mais non filtrée.

Chaque ballon ensemencé devant renfermer 1% de peptone.

II) A chaque tube ou ballon, on ajoute ensuite de l'acide phénique de façon à réaliser des systèmes renfermant 0,85% d'acide phénique.

III) Après mélange intime, les tubes et les ballons sont portés à l'étuve à 41°5 C.

Au bout de 14 à 16 heures, on examine les cultures. Les cultures qui se sont développées après ce laps de temps sont réensemencées dans un nouveau milieu phéniqué. On fait ainsi trois passages successifs. Puis, on ensemence sur plaques de gélose, pour isoler une colonie et procéder à l'identification du Colibacille sur les milieux usuels. Cette identification se fait par passage sur une série de milieux de culture.

Définition du Colibacille.

De nombreux auteurs ont signalé la confusion qui régnait sur l'ensemble des caractères à attribuer au Colibacille. Récemment encore, ROCHAIX (1925) constate que certains auteurs ont fait du genre *Coli* un véritable *caput mortuum* de la bactériologie. Il en découle tout naturellement une certaine imprécision puisque, de ce fait, se trouvent classés dans le groupe des Colibacilles des germes qui ne devraient probablement pas s'y trouver; les conséquences en sont une addition indéfinie de propriétés nouvelles et une multiplication des variétés de l'espèce. Quand un groupe est mal défini, on est très vite tenté d'y faire rentrer tous les cas douteux, d'y classer les germes que l'on n'a pu identifier, pour peu qu'ils présentent un minimum de points communs avec le germe type. Ces tendances sont dangereuses car elles contribuent pour une grande part à augmenter la confusion et à retarder la mise au point d'une définition.

Ph. LASSEUR, J. MARCHAL et A. DUPAIX (1) rappellent

(1) Travaux du laboratoire de microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy 1930. Fascicule III.

la phrase de E. DUCLAUX où cet auteur montre la difficulté qu'il y a pour chaque microbe à trouver « un petit nombre de propriétés assez nettes et assez constantes ». En face de ces difficultés, LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX montrent les bactériologistes divisés en deux clans dont l'un « considérant qu'une souche microbienne peut subir de telles transformations de formes et de propriétés, suivant les conditions de milieu, que le concept (notion d'espèce microbienne) doit être abandonné ». Sans aller aussi loin, il semble qu'il puisse se trouver, pour des conditions bien déterminées, un ensemble de caractères permettant de classer un germe avec quelque certitude.

Pour le *Comité des Bactériologistes américains*, *B. coli communis* est ainsi décrit :

Bacterium coli commune (ESCHERICH 1886. Synonymie : *Bacillus coli communis* (ESCHERICH) STERNBERG 1892; *Bacillus coli verus*; *Bacterium coli* (ESCHERICH) LEHMANN et NEUMANN 1896; *Bacillus coli* (ESCHERICH) MIGULA 1900,

Caractères du Bacille :

0,5 μ sur 1 à 2 μ . Isolé, en diplobacilles ou en courtes chaînettes, mobile grâce à des fouets péritriches.

« GRAM négatif ».

Colonies sur gélatine :

Opaques, humides, blanc grisâtres, entières.

Ensemencement par piqûre sur gélatine :

Les colonies sont gris-blanchâtres, étendues, à bords ondulés, non liquéfiantes.

Colonies sur gélose :

Blanches à blanc jaunâtres, entières ou à bords ondulés humides, homogènes étendues.

Développement sur gélose inclinée :

Blanches à blanc jaunâtre, humides luisantes, étendues, devenant brun sale.

Bouillon :

Trouble, épais dépôt gris, pas de voile.

Lait tournesolé :

Rapide formation d'acide et coagulation; pas de peptonisation.

Pomme de terre :

Culture abondante, grisâtre à jaune brun, étendue.

Formation de gaz avec :

Dextrose, levulose, maltose, galactose, arabinose, raffinose, lactose, mannite, sorbite, dulcité, dextrine.

Production d'indol.

Réduction des nitrates en nitrites.

Odeur fécaloïde.

Aérobie.

Température optimum 37° C.

ROCHAIX (1925) propose la définition suivante pour le Colibacille : « Bacille à extrémités arrondies, aérobie facultatif, plus ou moins mobile, dépourvu de capsules, non sporulé, ne prenant pas le Gram, ne liquéfiant pas la gélatine, faisant fermenter le lactose, le glucose, le levulose, le maltose, le galactose, la mannite, pouvant, pour certaines races, faire fermenter la dulcité et le saccharose, donnant habituellement de l'indol décelable par les réactifs classiques, réduisant le rouge neutre ».

Pour identifier avec le Colibacille les souches obtenues

par la méthode de VINCENT, nous les avons cultivées sur les milieux suivants :

- 1^o Eau peptonée lactosée, additionnée de rouge neutre (1);
- 2^o Milieu d'ENDO;
- 3^o Gélose au plomb;
- 4^o Gélatine;
- 5^o Eau peptonée.

Nous avons considéré comme Colibacilles les germes qui satisfaisaient aux épreuves suivantes :

- 1^o Eau peptonée, lactosée, additionnée de rouge neutre : virage du milieu au jaune canari, avec fluorescence et dégagement gazeux;
- 2^o Milieu d'ENDO : colonies rouges;
- 3^o Gélose au plomb : pas de noircissement;
- 4^o Gélatine : pas de liquéfaction;
- 5^o Eau peptonée : production d'indol;
- 6^o Coloration de GRAM : les germes se décolorent;
- 7^o Examen à l'état frais : germes mobiles.

Variation et Dissociation.

Au cours de ce travail nous ne pouvons passer sous silence des faits de la plus haute importance concernant ce que l'on appelle la *dissociation bactérienne*, et qui sont susceptibles d'être d'un précieux secours pour le Clinicien et pour tous les Microbiologistes.

(1) L'eau peptonée employée est une solution de peptone à 3 % dans l'eau distillée; elle est ajustée à pH 7,8.

Pour un tube de 20 cm³ d'eau peptonée contenant 2 p. 1.000 de lactose, nous ajoutons 2/10 de cm³ d'une solution de rouge neutre à 1 %.

Ces proportions nous ont toujours donné satisfaction. Nous noterons qu'il faut éviter la trop grande concentration en lactose qui empêche d'obtenir le virage du colorant.

On sait que dès l'instant où apparaissent des divergences entre les germes constituant une espèce il y a dissociation : celle-ci se manifestant par l'obtention sur plaques de gélose de colonies présentant des aspects différents.

ARKWRIGHT (1921), après avoir isolé et caractérisé deux types de colonies chez les Bactéries du groupe Coli-typhique, a fixé la nomenclature admise par la plus grande partie des auteurs et concernant la dissociation bactérienne.

Dans les travaux parus depuis cette époque les Bactériologistes admettent avec ARKWRIGHT l'existence :

1° D'un type normal de colonie S (smooth) possédant un contour net, une surface lisse, humide constituée par des germes mobiles que l'on rencontrerait plus fréquemment dans les infections aiguës. Ce type serait bien différent du suivant;

2° D'un type variant R (rough) à surface sèche et rugueuse, possédant un contour déchiqueté, constitué par des germes immobiles que l'on rencontrerait plus particulièrement chez les convalescents, les porteurs de germes et les individus atteints d'infection chronique.

En dehors de l'aspect différent des colonies les types S et R possèderaient des propriétés qui permettraient de les différencier l'un de l'autre.

SEPPILLI (1932) a souligné la signification biologique de la phase R des Bactéries et son importance vis-à-vis de l'hygiène. Dans une remarquable publication faite en collaboration avec DENES (1933) ce savant a montré que les formes atypiques du Colibacille rencontrées dans les fèces, dans l'eau et les produits alimentaires, ne seraient autres que des types R du Colibacille.

D'autre part, pour ces Savants, le Colibacille typique ensemencé dans l'eau tendrait à évoluer d'une façon assez rapide vers la phase R. A la fin de cette transformation on assisterait à l'immobilisation du germe, et à une diminution notable de son activité fermentative.

De nombreuses expériences sur la dissociation sont encore nécessaires pour élucider certaines questions concernant les modifications que sont susceptibles de présenter les Bactéries. Nous ne voulons entrer dans le détail des causes d'erreur inhérentes à ce genre d'études, nous renverrons le Lecteur aux travaux de MARCHAL (1) sur cet important problème.

Conclusions

1) Dans le groupe du B. Coli sont comprises, d'après quelques auteurs, des espèces bactériennes qui effectivement n'ont rien à voir avec le B. coli, entité spécifique définie de laquelle elles ne sont pas dérivées et à laquelle on ne doit pas les attribuer.

2) Les formes dites « atypiques » du B. coli qui peuvent parfois s'isoler des fèces, plus souvent de l'eau, du terrain, des produits alimentaires, ne représentent que des variantes dans le sens « R » du B. coli typique. Celui-ci, à son tour, pour être le type normal et le plus répandu parmi les différents aspects du polymorphisme du Colibacille, ne constitue pas la plus grande expression dans le sens « S » du germe qui est capable d'une évolution spécifique parasitaire plus grande. Les expressions d'une spécificité de ce genre (qui se manifeste particulièrement dans la propriété antigène des souches) sont les souches du germe qu'on peut isoler des produits pathologiques des maladies déterminées par eux.

3) Les caractéristiques essentielles de la phase « R » du B. coli se résument, à part le caractère commun de rugosité des colonies et le mode de réagir à l'essai de

(1) Quelques faits nouveaux concernant la variation en Microbiologie
« Etude historique et critique de la dissociation bactérienne » (*Bull. As.
Dipl. Microbiol.*, 32 p., n° 6, 1933).

Quelques faits nouveaux concernant la variation et la dissociation en
Microbiologie (2^e mémoire). *Idem*, n° 7, 1933.

l'agglutination aspécifique, dans les trois points suivants :

a) Dans la perte complète de mobilité;
b) Dans une plus grande résistance au GRAM;
c) Dans une forte réduction des propriétés fermentatives spécifiques et, en particulier, de l'aptitude de faire fermenter les matières lactiques et de réduire le rouge neutre. Ce sont-là des attributs qui ne reconduisent pas le « cadre biochimique » à une expression très voisine de celle des phases « R » des autres germes du groupe typho-coli.

4) Le B. coli fécal, lorsqu'il arrive dans le milieu aquatique, tend à évoluer vers la phase « R » et cela d'autant plus rapidement que l'eau est naturellement pure.

5) La première manifestation de cette modification dans le sens « R » est représentée par l'immobilisation du germe; c'est de celle-ci que résultent ensuite les autres propriétés susmentionnées et particulièrement la diminution de l'activité fermentative sur les matières lactiques qui se manifeste dans les cultures isolantes avec la formation de colonies à peine rosées ou tout bleues dans DRIGALSKI, et rosées ou tout à fait incolores dans le terrain d'ENDO.

6) Le germe ainsi modifié survit dans l'eau encore longtemps, au moins dans la plupart des cas, c'est-à-dire quand n'interviennent pas des aptitudes bactériolytiques de l'eau en question, soit en fonction de la présence d'éléments corpusculaires métalliques de nature colloïdale (CASAGRANDE), soit en fonction d'antagonismes biologiques (concurrence microbienne, bactériophage).

7) Tout ceci rend compréhensible le fait que, dans une eau bactériologiquement pure, le Colibacille fécal typique ne s'isole jamais tandis qu'il est démontré que le B. coli survit la plupart du temps dans les eaux communes et, en se modifiant, a une diffusion quasi universelle. Cela donne aussi une idée de la difficulté mentionnée au début de ce travail qu'on rencontre dans la délimitation de l'espèce et dans le système des espèces voisines.

8) Au contraire, ce que nous avons dit ci-dessus ne modifie nullement, mais confirme, par une interprétation rationnelle, les critères généralement suivis dans les recherches bactériologiques des eaux ayant pour but une expertise sanitaire, pourvu qu'on tienne compte de la distinction désormais universellement admise entre le Colibacille fécal et les formes bactériologiquement rapprochées.

RÉSUMÉ.

Les auteurs, après avoir passé en revue la littérature concernant les variations du B. coli dans les eaux et les rapports entre le B. coli et les formes bactériologiquement rapprochées, rapportent les résultats de leurs recherches à ce sujet qui conduisent à la démonstration que, dans le milieu aquatique, le B. coli varie dans le sens de la phase « R » et que c'est à cette phase qu'on doit reconduire, pour la majeure partie, les « formes atypiques » des germes qui s'isolent dans ce milieu.

Estimation quantitative de l'indol dans les cultures de Colibacille.

Nous avons vu que le principal reproche que l'on pouvait faire à la réaction de SALWKOSKI était de donner parfois une très légère coloration avec des cultures de germes non indologènes mais produisant de l'acide indol-acétique. Cet inconvénient disparaît lorsque la réaction de SALKOWSKI est employée pour l'étude de la fonction indologène d'une espèce déterminée, en l'occasion le Colibacille. C'est bien ce qu'a compris GUILLERD lorsqu'il utilise la réaction de SALKOWSKI pour doser l'indol à l'aide de son échelle colorimétrique (1). Cette méthode est d'une réalisation et d'un emploi facile; c'est actuellement, pensons-

(1) GUILLARD. *Notions d'hydrologie appliquée à l'hygiène*. Paris, 1923.

nous, le seul procédé vraiment pratique pour l'étude de la fonction indologène du Colibacille.

Voici comment l'auteur recommande d'opérer :

La réaction est effectuée sur des tubes de cultures en eau peptonée de 10 cm³ âgées de 48 heures.

On ajoute dans le tube 4 cm³ d'alcool amylique et l'on émulsionne par agitation pour rassembler l'indol, puis on ajoute 2 cm³ d'un réactif préparé extemporanément par mélange de 90 cm³ d'acide sulfurique ou d'acide chlorhydrique avec 10 cm³ d'une solution de nitrite de soude à 1 0/00.

L'échelle servant à l'appréciation quantitative de la réaction se prépare ainsi :

On fait une solution d'indol au 1/10.000^e, on en prend :

a) 5 cm ³	que l'on complète à 10 cm ³	avec de l'eau distillée.
b) 3	—	10 —
c) 2	—	10 —
d) 1	—	10 —
e) 0,5	—	10 —
f) 0,25	—	10 —

On ajoute dans chaque tube les mêmes quantités d'alcool amylique et de réactif de SALKOWSKI que celles indiquées ci-dessus.

On obtient ainsi toute une gamme décroissante de colorations rouges correspondant à des concentrations en indol de :

<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>
1/20.000 ^e	1/33.00 ^e	1/50.000 ^e
<u>d</u>	<u>e</u>	<u>f</u>
1/100.000 ^e	1/200.000 ^e	1/400.000 ^e

Nous avons employé uniquement l'acide chlorhydrique pour la préparation du réactif car, avec l'acide sulfurique, la coloration n'est pas stable et passe rapidement du rouge au brun, ce qui constitue un inconvénient grave. Il faut,

de plus, employer de l'alcool amylique frais et incolore, l'alcool amylique vieilli et jaunâtre nuisant fortement à la netteté de la réaction.

Nous voici donc maintenant en possession :

- 1° D'une technique d'isolement du Colibacille;
- 2° D'un procédé d'estimation quantitative de l'indol produit dans les milieux de culture au sein desquels le Colibacille s'est développé.

Avant d'aborder l'étude du comportement de *B. coli communis* dans les eaux de consommation, nous allons réunir, dans le chapitre suivant, les recherches personnelles effectuées dans le but de vérifier l'influence de divers facteurs sur la fonction indologène du Colibacille.

CHAPITRE II

INFLUENCE DES BACILLES TYPHIQUES ET PARATYPHIQUES SUR LA FONCTION INDOLOGÈNE DU COLIBACILLE

I. — *Historique.*

L'action du Bacille d'EBERTH sur le Bacille d'ESCHERICH a suscité de nombreuses recherches. On a prétendu tour à tour que le Bacille typhique empêchait ou ne s'opposait pas à la production d'indol par le Colibacille.

La question de savoir si le Bacille d'EBERTH peut ou ne peut pas produire d'indol a été également discutée.

En 1892, PÉRÉ déclare que, dans les nombreuses circonstances où il a effectué la recherche de l'indol dans des cultures de Bacille d'EBERTH, les résultats obtenus ont toujours été négatifs. PÉRÉ cultivait le Bacille typhique en milieux à base de syntonine (1), sur eau peptonée (peptone trypsique) et sur bouillon de viande.

La recherche de l'indol fut négative pendant une durée de soixante jours.

PÉRÉ effectuait ses réactions de la façon suivante :

« Après un ou deux jours de culture à 36° au contact ou à l'abri de l'air, pour 10 cc de culture, on ajoutera 1 cc de solution d'azotite de potassium et 5 à 6 gouttes d'acide sulfurique pur. »

NONOTTE et DEMANCHE en 1908 suivent pendant huit jours des cultures de Bacille d'EBERTH et de Bacilles paratyphiques qui ne leur donnent jamais la moindre trace d'indol.

(1) Protéine de transformation (acid albumines).

En 1910, CROSSONINI étudie un Bacille typhique dont les cultures offrent une réaction de SALKOWSKI positive et une réaction d'EHRlich négative; par contre, les deux réactions sont négatives, lorsqu'elles sont effectuées sur le distillat de la culture.

L'auteur conclut qu'il s'agit de scatol et non d'indol. Gauthier (1912) trouve que le développement dans un même milieu du Bacille d'EBERTH et du Colibacille n'entrave en rien la fonction indologène de ce dernier. Contrairement à cet auteur, DOPTER et SACQUÉPEC rapportent les faits suivants : « Si onensemence en même temps les deux microbes (1) dans un même milieu, on ne retrouve plus que le Colibacille après quelques jours.

« D'après RÉMY, dans l'expérience précédente, les deux microbes se modifient, le coli perd ses propriétés fermentatives et ne donne plus d'indol. »

A plusieurs reprise, VIGNATI (1926) a constaté que le Bacille typhique empêche la croissance du Colibacille. Cette action n'est que passagère, elle se manifeste pendant la période de développement de la culture du Bacille typhique jusqu'à ce que cette dernière soit arrivée à *maturation*, c'est-à-dire, d'après BAIL, au moment où la culture renferme le nombre maximum de germes vivants. Arrivée à ce terme, la culture de Bacilles typhiques a perdu son pouvoir inhibiteur vis-à-vis du Colibacille. A ce moment, il n'y a théoriquement plus d'obstacle au développement de ce dernier.

On sait qu'en 1890 RODET et ROUX avaient pensé pouvoir assimiler le *B. coli communis* avec le Bacille d'EBERTH, ce dernier se présentant comme le résultat de la modification que le *B. coli communis* éprouve en traversant l'organisme. On pouvait croire cette conception définitivement abandonnée à l'heure actuelle, mais BELONOWSKI, LAPINSKAYA et ROSENFELD, en 1931, prétendent à nouveau que, dans

(1) Le Bacille d'Eberth et le Colibacille.

l'organisme humain, le Colibacille se transformerait en Bacille typhique. Ils en veulent pour preuve une certaine tendance, marquée par la variété de Colibacilles qu'ils étudient, à acquérir certaines propriétés du Bacille d'EBERTH. BELONOWSKI, LAPINSKAYA et ROSENFELD remarquent en particulier une diminution du pouvoir indologène de leur Colibacille.

De nombreux auteurs se sont élevés contre cette identification des deux bacilles. Nous rapporterons à ce sujet l'opinion de GARTNER qu'il a donnée au cours de la 68^e réunion annuelle de la Société allemande des spécialistes du *Gaz et de l'eau*. Le savant allemand s'exprime ainsi : « D'abord, je voudrais affirmer, moi aussi, que la fièvre typhoïde n'est provoquée que par les Bacilles typhiques. Il n'y a pas de fièvre typhoïde sans le Bacille typhique et si nous avons pu voir des modifications chez le Bacille typhique, elles sont de nature insignifiante. Il n'est pas possible que le B. Coli se transforme en un B. typhique.

II. — *Recherches personnelles.*

Désirant nous rendre compte dans quelle mesure le Bacille typhique peut modifier la fonction indologène du Colibacille, nous avons procédé aux expériences suivantes :

Technique expérimentale :

Des séries de tubes *a*, *b*, *c*, *d*..., reçoivent pour chaque tube 7 cm³ d'eau peptonée. Après stérilisation, chacun des tubes estensemencé successivement :

1^o Avec une anse de platine d'une culture de Colibacille effectuée sur gélose et âgée de 48 heures;

2^o Avec une anse de culture de Bacille d'EBERTH obtenue dans les mêmes conditions.

Les cultures témoins sont constituées par des tubes d'eau peptonéeensemencés avec une anse de Colibacilles.

Résultats expérimentaux :

Nous avons, dans tous les cas, obtenu une réaction de l'indol plus ou moins forte, mais toujours positive, avec les réactifs de LEGAL et de SALKOWSKI.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Désignation des séries de cultures mixtes Colibacilles + Bacilles d'Eberth.		Recherche de l'Indol après un séjour de 48 h. à l'étuve à 37° C.		Recherche de l'Indol après un séjour de 8 jours à l'étude à 37°C.	
		Réaction de Legal	Réaction de Salkowski	Réaction de Legal	Réaction de Salkowski
1 ^{re} série	a.....	+	+		
	b.....	+	+		
	c.....	+	+		
	d.....	+	+		
2 ^e série	a ₁	+	+		
	b ₁	+	+		
	c ₁	+	+		
	d ₁	+	+		
3 ^e série	a ₂	+	+		
	b ₂	+	+		
	c ₂	+	+		
	d ₂	+	+		
4 ^e série	a ₃			+	+
	b ₃			+	+
	c ₃			+	+
	d ₃			+	+

Afin de s'assurer que la totalité des plastides constituant la population de la souche de Colibacilles n'avait pas été modifiée par son contact avec le Bacille typhique, nous avons procédé à l'isolement d'un grand nombre de plastides, réalisant ainsi des cultures pures de Colibacilles à partir des cultures mixtes.

Toutes les souches de Colibacilles ainsi isolées offrent un pouvoir indologène très marqué, se traduisant par une belle réaction de l'indol.

De ces faits d'expérience établissant que le Colibacille

produit de l'indol en culture mixte avec le Bacille d'EBERTH il faut rapprocher le fait d'observation suivant :

A Paris, on nous a donné un jour un tube de culture étiqueté Para B. et qui était signalé comme donnant un peu d'indol. Nous avons étudié cette souche et obtenu les résultats suivants :

Un tube d'eau peptonée a tout d'abord été ensemencé à partir de cette culture; le tube ainsi ensemencé a donné, au bout de 48 heures de séjour à l'étuve à 37°, une réaction de GUILLERD égale à 3-4 (1). A partir de cette culture, trois passages en eau peptonée phéniquée ont été effectués. Au troisième passage, nous avons obtenu une réaction de GUILLERD égale à 2-3. La réaction de LEGAL-DENIGÈS était également positive. La souche obtenue présentait les caractères suivants :

1° *Examen au microscope à l'état frais et sans coloration.* — Germes doués d'une faible motilité;

2° *Gélose au plomb.* — Noircissement léger aux endroits des piqûres. Le noircissement ne gagne pas la culture qui se développe autour des points de piqûres;

3° *Eau peptonée lactosée additionnée de rouge neutre.* — Virage au jaune canari, fluorescence, abondant dégagement gazeux;

4° *Gélatine.* — Colonies non liquéfiantes.

Cette soi-disant souche de Para B. présentait donc les caractères cultureux du Colibacille.

Dans ce cas particulier, il s'agissait vraisemblablement à l'origine d'une culture mixte de Para B et de Colibacille, dans laquelle dominait au début le Para B. et qui s'est enrichie en Colibacilles par passages en milieux phéniqués.

(1) Lorsque, dans nos résultats, nous écrivons : réaction de Guillard = 1 ou réaction de Guillard = 2, le lecteur sous entendra que la réaction obtenue correspond au tube *a* ou au tube *b* de l'échelle (Voir p. 45). Par contre, lorsque nous indiquons : réaction de Guillard = 1 — 2 ou réaction de Guillard = 3 — 4, il faut en déduire que la coloration obtenue est intermédiaire entre celles des tubes *a* et *b* ou des tubes *c* et *d*.

A ce propos, nous rappellerons qu'on ne saurait trop insister sur la difficulté que l'on éprouve à obtenir une culture ayant pour origine une seule plastide bactérienne. Même avec du matériel particulièrement favorable, un de nos camarades (1), au laboratoire de M. LASSEUR, a dû effectuer 12 isollements sur plaques de gélose « et cependant on ne comptait que quelques colonies paraissant parfaitement isolées par boîte de ROUX ou par boîte de PÉTRI utilisée; ce n'est qu'au treizième passage que la séparation des deux germes fut réalisée. Il n'y a qu'un seul moyen d'obtenir une culture pure, c'est d'adopter des techniques permettant l'obtention d'une colonie à partir d'un germe unique. » (2)

Cette difficulté que l'on éprouve d'aboutir à une culture pure, par les procédés habituellement en pratique dans les laboratoires, constitue une source d'erreurs très grave dans l'identification d'une espèce microbienne. Nous ajouterons qu'il ne suffit pas d'avoir une culture ayant pour origine une seule plastide, encore faut-il placer la population bactérienne dans un milieu chimiquement défini, fait sur lequel ont si longuement insisté LASSEUR et ses Collaborateurs.

Culture du Colibacille en milieu phéniqué Ses conséquences sur la production de l'indol.

I. — Historique.

En 1921, FABRY étudie les modifications de la fonction indologène du Colibacille sous l'action de l'acide phéniqué. Il écrit à ce sujet : « Après une trentaine de jours de pas-

(1) BIDZINSKI (Thèse Pharmacie, Nancy, 1926).

(2) A ce sujet, consulter les travaux de LASSEUR, MARCHAL, DUPAIX et MARCHAL (thèse sciences naturelles, Nancy, 1932).

sages dans ce bouillon phéniqué (1), le B. Coli, ensemencé en eau peptonée Dunham (peptone Witte ou Difco), cesse de donner de l'indol (réaction d'EHRlich négative). Le B. Coli ainsi modifié a pu être repiqué 95 jours en eau peptonée Dunham; chaque jour, il fut examiné au point de vue de sa production d'indol et chaque fois la réaction d'EHRlich fut trouvée négative. Le bacille reste tel quel après passage dans le péritoire du cobaye. » FABRY étudie ensuite l'agglutination de son Bacille Coli modifié. Il constate que ce Bacille fait apparaître dans le sang des animaux injectés des agglutines spécifiques pour ce nouveau type seulement.

II. — *Recherches personnelles.*

Dans le but d'étudier la disparition éventuelle de la fonction indologène, nous avons ensemencé une souche de Colibacille (variété H) sur eau peptonée phéniquée à 1 p. 1000.

Au moment où nous commençons l'expérience, la souche de Colibacille (H) donne sur eau peptonée simple (2) une réaction de GUILLERD égale à 2.

Technique expérimentale :

Avec la souche primitive, on ensemence une série de tubes *a*, *b*, *c*, *d*... Le milieu est phéniqué à 1 p. 1000 et les tubes ensemencés mis à l'étuve à 41°.

Après 3 jours de séjour à l'étuve, les tubes servent à réensemencer une série de tubes *a1*, *b1*, *c1*, *d1*...

La recherche de l'indol est effectuée dans les tubes *a*, *b*, *c*, *d*... Les tubes *a1*, *b1*, *c1*, *d1*, ayant séjourné 4 jours à 41°, sont réensemencés dans une nouvelle série de tubes

(1) Le bouillon dans lequel FABRY a progressivement entraîné son Colibacille à vivre est du bouillon contenant 2 p. 1.000 d'acide phénique.

(2) Nous appelons eau peptonée simple une solution de peptone à 3 % dans l'eau distillée et de pH 7,8.

*a*2, *b*2... On effectue la recherche de l'indol dans les tubes
*a*1, *b*1, *c*1... Cinq passages sont ainsi effectués.

Résultats expérimentaux :

Nous résumons dans le tableau suivant la marche générale du développement bactérien d'une part et de la fonction indologène de l'autre.

TABLEAU

	1 ^{er} passage sur milieu phéniqué. Temps de séjour à l'étuve : 3 jours	2 ^e passage sur milieu phéniqué. Temps de séjour à l'étuve : 4 jours	3 ^e passage sur milieu phéniqué. Temps de séjour à l'étuve : 4 jours	4 ^e passage sur milieu phéniqué. Temps de séjour à l'étuve : 43 jours	5 ^e passage sur milieu phéniqué. Temps de séjour à l'étuve : 3 jours
Marche générale du développement bactérien	Expériences a.....	+	+	+	+
	— b.....	+	+	+	+
	— c.....	+	+	+	0
	— d.....	+	+	+	0
	— e.....	+	+	+	+
	— f.....	+	+	+	+
Variation de la fonction indogène	Expériences a.....	3-4	3	3	1-2
	— b.....	4	3-4	3	3-2
	— c.....	4-5	4	4	0
	— d.....	4	4	4-3	0
	— e.....	4	3	3	1-2
	— f.....	3-4	3	3	1-2

(1) Les signes + correspondent respectivement aux appréciations suivantes :
+ développement faible.
— + assez abondant.
++ abondant.

(1) Les signes + correspondent respectivement aux appréciations suivantes :
+ développement faible.
- + — assez abondant.
+ + + — abondant.

Il est à remarquer que toutes les souches issues de la culture primitive ne sont pas également résistantes à l'acide phénique et que certaines ne dépassent pas le quatrième passage en milieu phéniqué. Par contre, lorsque les Bactéries offrent un degré d'accoutumance à l'acide phénique suffisant pour donner un développement abondant de la culture, nous assistons, non seulement au maintien, mais à l'exaltation de la fonction indologène.

Le Colibacille paraissant se développer normalement sur milieu phéniqué à 1 p. 1000, nous avons pensé qu'il serait possible d'obtenir une croissance normale à des concentrations plus élevées, de l'ordre de celles observées par FABRY, soit 2 p. 1000.

Des circonstances indépendantes de notre volonté nous ont obligé à interrompre cette expérience. Nous avons résolu de conserver une des souches de Colibacilles étudiées. Craignant qu'elle ne puisse résister plusieurs mois dans un milieu renfermant 1 p. 1000 d'acide phénique, nous l'avonsensemencée en eau peptonée phéniquée à 0,85 p. 1000. C'est cette culture qui, après un séjour de 24 heures à l'étuve à 41°5 C. a été scellée et conservée à l'abri de la lumière et à la température ordinaire.

Les essais ont été repris 5 mois plus tard.

Le tube est ouvert avec toutes les précautions bactériologiques et le contenuensemencé sur eau peptonée. 48 heures plus tard, la réaction de GUILLERD est égale à 3. Au troisième passage, elle est égale à 2.

Le Colibacille est alors repiqué sur eau peptonée phéniquée à 1 p. 1000.

24 heures plus tard il est repiqué sur eau peptonée à 1,5 p. 1000.

24 heures plus tard il est repiqué sur eau peptonée à 2 p. 1000.

A partir de ce moment, le germe est constamment repiqué sur eau peptonée phéniquée à 2 p. 1000 à des intervalles de 48 heures. Après le septième passage sur milieu

phéniqué à 2 p. 1000, le Colibacille donne par ensemencement sur eau peptonée non phéniquée une réaction de GUILLERD égale à 3.

Au dixième passage, sur milieu phéniqué à 2 p. 1000, le germe donne encore dans les mêmes conditions une réaction égale à 3.

Après le dixième passage, le tube est scellé et conservé dans une armoire à la température ordinaire pendant 5 mois.

Passé ce délai, le contenu du tube est ensemencé sur eau peptonée ordinaire. Dès le deuxième passage, la culture est abondante et la réaction de l'indol égale à 2-3.

Pour nous assurer de l'identité de notre Colibacille, nous l'avons à ce moment ensemencé sur les milieux usuels. La souche avait conservé ses caractères initiaux.

En conclusion de cette expérience, nous constatons que la fonction indologène du Colibacille étudié n'a été nullement modifiée par l'acide phénique à la concentration de 2 p. 1000.

Production d'indol par le Colibacille en milieu anaérobie

I. — Historique.

Au sujet de la production d'indol par le Colibacille en milieu anaérobie, SICRE déclare en 1909 : les « cultures en anaérobiose donnent des quantités d'indol plus élevées que les cultures en milieu aérobie. »

PORCHER (1909) dit que « le B. Coli en milieu aérobie donne surtout de l'acide scatol-carbonique et de l'indol; en cultures anaérobies de *Rauschbrand bacillus* ou de B. Coli, on a surtout de l'acide scatol-acétique. »

MACÉ, en 1912, dans son *Traité de Bactériologie*, écrit que « aux dépens des peptones, en cultures aérobies, il se forme rapidement de l'indol. En cultures anaérobies, il ne se forme que très peu ou pas du tout d'indol. »

II. — *Recherches personnelles.*

Nous avons ensemencé plusieurs tubes d'eau peptonée avec du Colibacille; immédiatement après l'ensemencement, de l'azote était substitué à l'air contenu dans chaque tube (1) et les tubes étaient ensuite scellés à la lampe. Nous avons effectué au bout de 48 heures, la recherche de l'indol, partie par la méthode de GUILLERD, partie par le réactif d'EHRlich. La méthode de GUILLERD nous a donné une réaction correspondant à $1/33.000^e$ d'indol (n° 2 de l'échelle); le réactif d'EHRlich nous a donné des réactions correspondant à $1/20.000^e$ et $1/50.000^e$ d'indol (tubes témoins réalisés à l'aide d'une solution alcoolique d'indol.

Action de la composition du milieu nutritif sur la fonction indologène du Colibacille.

¶ Nous rappellerons ce fait bien connu que, cultivé dans de l'eau peptonée sucrée, le Colibacille ne donne pas d'indol. Dès 1892, PÉRÉ signale le fait en remarquant la non-production d'indol tant qu'il y a du sucre dans le milieu de culture. Il constate en outre, ainsi que nous l'avons déjà signalé, que la culture même prolongée, sur milieu sucré, ne provoque pas d'atténuation de la fonction indologène et que le Colibacille transporté de nouveau dans une solution de peptone pure y fait de l'indol comme le microbe originel.

En 1913, DISTASO cherche à expliquer la raison pour laquelle la fonction indologène du Colibacille est annihilée par la présence de sucre en milieu peptoné et il écrit à ce sujet : « Dans une note précédente, nous avons démontré que les différentes races de *B. Coli* produisent toujours de l'indol en milieu au tryptophane. En plus, nous avons

(1) A l'aide d'une trompe à eau, on effectuait le vide et on faisait ensuite rentrer de l'azote.

L'opération était répétée 5 fois.

constaté qu'il y a aussi production d'indol quand, à ce milieu, on ajoute 1% de glucose ou de lactose, et cela même lorsque la réaction du milieu est acide. On sait d'autre part que le colibacille en milieux peptonés et sucrés ne forme pas d'indol.

« Dans le but d'éclaircir cette question, nous avons entrepris les expériences suivantes. Ainsi, au milieu au tryptophane, nous avons ajouté de l'asparagine. La réaction ici se fait comme dans le milieu au tryptophane seul. A ce milieu asparagine tryptophane, on ajoute respectivement du glucose et du lactose à 1%.

« Dans les tubes avec le lactose (acide), la réaction de l'indol est positive, quoique colorimétriquement plus faible, tandis que, dans les tubes au glucose (acide), la réaction est absente ou si faible qu'elle est négligeable.

« A quoi tient cette différence? Selon nous, le Colibacille agit selon une loi de biologie générale : se mouvoir avec le moindre effort.

« Dans le premier cas, notre microbe trouvait le tryptophane comme unique source azotée, le dédoublait et produisait de l'indol. Ensuite, il attaquait le glucose quand l'indol était déjà produit. Dans le deuxième cas, il attaquait l'asparagine d'abord et ensuite se tournait vers le glucose en laissant de côté le tryptophane.

« Au contraire, dans le cas du lactose, la production de l'indol était constante. Ici, il n'y a qu'une explication possible : c'est que le colibacille secrète l'invertase très tardivement ou qu'elle est très peu active.

« Ces expériences peuvent-elles expliquer ce qui se passe dans les milieux peptonés et sucrés? La peptone est une substance très complexe, elle contient des noyaux beaucoup plus simples que le tryptophane, qui sont attaqués préalablement comme dans le cas de notre milieu à asparagine; ensuite les microbes, en ayant leur nourriture azotée, se tournent vers les sucres, laissent de côté le tryptophane et par conséquent l'indol n'est pas formé.

« Donc, ce n'est pas l'acidité, comme on l'a soutenu, qui empêche la production de l'indol, mais la facilité avec laquelle certains microbes dégradent des substances moins complexes d'abord. »

Les quelques recherches que nous avons rassemblées dans les pages précédentes sont donc toutes favorables à la conception du Colibacille producteur régulier d'indol pour les conditions de culture déterminées.

Dans les pages qui suivent, nous allons donner les résultats de l'étude de la fonction indologène du Colibacille après des temps de séjour dans l'eau plus ou moins longs.

CHAPITRE III

INFLUENCE DU SÉJOUR DANS L'EAU SUR LA FONCTION INDOLOGÈNE DU COLIBACILLE

(Recherches personnelles.)

Les recherches dont nous allons donner ci-joint les résultats ont été effectuées au cours des expériences sur la persistance du Colibacille dans l'eau. Les techniques de ces expériences sont données au chapitre VI. Pour éviter les répétitions, nous nous bornerons à indiquer ici, pour chaque expérience, la nature de l'eau utilisée; nous y joindrons la référence permettant de se reporter à la technique expérimentale correspondante.

Expérience I.

Technique expérimentale. — Colibacilles ensemencés dans des tubes d'eau de conduite stérilisée. (Voir expérience I, 1^{re} série, p. 104). Souches étudiées : Colibacille (selles I. P.), Colibacille (Loire II), Colibacille (x), Colibacille (H.).

Résultats expérimentaux. — La recherche du pouvoir indologène est effectuée après un séjour dans l'eau de 17 mois.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Désignation des souches	Pouvoir indologène (réaction de Guillard (1))
Colibacille (selles I. P.)	= 2
Colibacille (Loire II.)	= 2-3
Colibacille (x)	= 3
Colibacille (H)	= 2-3

(1) Exprimée en unités arbitraires.

Expérience II.

Technique expérimentale. — Colibacilles ensemencés dans des tubes d'eau de conduite stérilisée (Voir expérience II, 1^{re} série, p. 107). Souches étudiées : Colibacille (conserves), Colibacille (selles I. P.), Colibacille (selles L).

Résultats expérimentaux. — La recherche du pouvoir indologène est effectuée après un séjour dans l'eau de 5 mois.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Désignation des souches	Pouvoir indologène (réaction de Guillard) (1)
Colibacille (conserves).....	= 2
Colibacille (selles I. P.).....	= 1-2
Colibacille (selles L).....	= 1-2

Expérience III.

Technique expérimentale. — Colibacilles ensemencés dans de l'eau distillée stérilisée contenant 1% d'asparagine (Voir expérience III, 1^{re} série, p. 108).

Souche étudiée : Colibacille (selles L).

Résultats expérimentaux. — La recherche du pouvoir indologène est effectuée après des temps de séjour dans l'eau de 6, 9, 15 et 20 mois.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps du séjour du Colibacille dans l'eau	Pouvoir indologène Réaction de Guillard (1)
6 mois.....	= 2
9 mois.....	= 2-3
15 mois.....	= 2
20 mois.....	= 2

Expérience IV.

Technique expérimentale. — Une souche de Colibacilles

(1) Exprimée en unités arbitraires.

récemment isolés de selles est ensemencée dans un ballon renfermant deux litres d'eau de conduite stérile (Voir expérience IV, 1^{re} série, p. 109).

Résultats expérimentaux. — La recherche du pouvoir indologène est effectuée après 1 et 2 mois.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps du séjour du Colibacille dans l'eau	Pouvoir indologène Réaction de Guillard (1)
1 mois	= 2-3
2 mois	= 2

Expérience V.

Technique expérimentale. — Un litre d'eau de conduite est contaminé avec des selles (Voir expérience V, 1^{re} série, p. 110).

Résultats expérimentaux. — La recherche du pouvoir indologène est effectuée après 1, 2, 3, 4 mois.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps de séjour du Colibacille dans l'eau	Pouvoir indologène Réaction de Guillard (1)
1 mois	= 2
2 mois	= 2-3
3 mois	= 2-3
4 mois	= 2-3

Expérience VI.

Technique expérimentale. — Différents mélanges de Colibacilles et de Staphylocoques ou de Colibacilles et de sarcines sont ensemencés dans des tubes d'eau de conduite stérilisée (Voir expérience VI, 1^{re} série, p. 111).

Résultats expérimentaux. — Des prélèvements sont effectués au bout de 14, 27, 67 jours, etc., en vue de déterminer le pouvoir indologène des souches de Colibacilles ainsi isolées.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

(1) Exprimée en unités arbitraires.

Désignation des associations microbiennes	PRÉLÈVEMENTS EFFECTUÉS APRÈS :											
	14 jours	27 jours	67 jours	86 jours	142 jours	145 jours	153 jours	165 jours	168 jours	262 jours	379 jours	538 jours
Colibacille (x)	2-3	2-3	3	1	2	2			1		Colib. disparus	
+ Staphylocoque												
Colibacille (x)	2-3	2-3	3		Colib. disparus							
+ Sarcine												
Colibacille (y)	2-3	2-3		1		Colib. disparus						
+ Staphylocoque												
Colibacille (y)	2-3	3		1	2	1			1-3	2	Colib. disparus	
+ Sarcine												
Colibacille (Loire II)	2-3	2-3	1-2			2	1		1	2	3	Colib. disparus
+ Staphylocoque												
Colibacille (Loire II)	2-3	2-3	1-2			1	1		1	2	Colib. disparus	
+ Sarcine												
Colibacille (selles L.)	2-3	3-4				2-3		1	1		Colib. disparus	
+ Staphylocoque												
Colibacille (selles L.)	2-3	3				2		2	1		1-2	Colib. disparus
+ Sarcine												

N. B. — A partir du moment où les cases du tableau portent la mention Colib. disparus il faut comprendre que les tentatives faites pour obtenir une souche de Colibacilles sont infructueuses.

N. B. — A partir du moment où les cases du tableau portent la mention Colib. disparus il faut comprendre que les tentatives faites pour obtenir une souche de Colibacilles sont infructueuses.

Expérience VII.

Technique expérimentale. — Colibacilles ensemencés dans des tubes d'eau de conduite stérile (Voir expérience VII, 1^{er} série, p. 112).

Souches étudiées : Colibacille (selles L), Colibacille (H).

Résultats expérimentaux. — La recherche du pouvoir indologène est effectuée après un séjour d'un an dans l'eau de conduite stérile.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Désignation des souches	Pouvoir indologène
Colibacille (selles L)	= 2-3
Colibacille (H)	= 2-3

Expérience VIII.

Technique expérimentale. — Du Colibacille (H) est ensemencé dans un bac de verre contenant de l'eau de conduite, du sable et des plantes diverses (Voir expérience III, 2^e série, p. 116).

Résultats expérimentaux. — Au bout de huit jours, un prélèvement d'eau (10 cm³) est effectué dans le bac de verre. L'eau est ensemencée dans des tubes d'eau peptonée phéniquée. Après les trois passages classiques, il est procédé à l'ensemencement des boîtes de PETRI. Cinquante colonies de Colibacilles sont prélevées dans ces boîtes. La recherche de leurs pouvoirs indologènes respectifs donne les résultats suivants :

43 souches donnent des réactions de GUILLERD égales à 1	1
6 — — — — —	1-2
1 souches donne une réaction de GUILLERD égale à 2	2

Expérience IX.

Technique expérimentale. — Du Colibacille (H) est ensemencé dans un bac de verre contenant de l'eau de conduite, du sable et des plantes diverses (Voir expérience IV, 2^e série, p. 116).

Résultats expérimentaux. — Au bout de 8 jours, 10 colonies de Colibacilles sont obtenues par le même procédé que celui indiqué dans l'expérience précédente.

Les résultats obtenus sont les suivants :

6 souches	donnent	des réactions	de GUILLERD	égales à	2
2	—	—	—	—	2-3
1 souche	donne	une réaction	de GUILLERD	égale à	1
1	—	—	—	—	1-2

Expérience X.

Technique expérimentale. — Un bac de verre planté est établi avec de l'eau de Meurthe contenant des Colibacilles (Voir expérience I, 3^e série, p. 117).

Résultats expérimentaux. — Au bout de 8 jours, 4 colonies de Colibacilles sont isolées de l'eau du bas toujours par le même procédé.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1 souche	donne	une réaction	de GUILLERD	égale à	3-4
1	—	—	—	—	2-3
2 souches	donnent	des réactions	de GUILLERD	égales à	3

De ces recherches, il ne semble pas que l'on puisse conclure à la diminution de la fonction indologène du Colibacille en conséquence d'un long séjour dans l'eau.

Ce que nous avons pu observer, c'est un parallélisme entre la vitalité des germes et l'intensité de la fonction indologène; mais c'est là un fait très banal auquel il fallait s'attendre.

Quelle peut être l'action sur le pouvoir indologène du Colibacille, d'un germe comme le *B. subtilis* qui est un saprophyte des eaux excessivement commun? C'est ce qui fait l'objet du paragraphe suivant.

Cultures mixtes de Colibacille et de *B. subtilis*.

Recherches personnelles sur le comportement du Colibacille et de sa fonction indologène.

1^{re} Série d'essais.

Parmi la flore bactérienne des eaux, le *B. subtilis* occupe une place importante. C'est un des germes les plus fréquents dans la nature et c'est pour cette raison que nous avons résolu d'étudier son influence possible sur la vitalité du Colibacille.

Dans ce but, nous avons réalisé des cultures mixtes de diverses souches de Colibacilles et de *B. subtilis*.

Technique expérimentale. — Le milieu de culture est constitué par de l'eau peptonée à 3% et de pH 7,6. Il est réparti dans des tubes de verre à raison de 7 cm³ environ de milieu par tube. Ces tubes sontensemencés avec des quantités sensiblement égales d'émulsions de Colibacilles et de *B. subtilis*. Ces émulsions sont réalisées en eau peptonée à partir de cultures sur gélose âgées de 48 heures de *B. subtilis* et de Colibacille. Les cultures sont placées à l'étude à 37°.

N. B. — Pour toutes les expériences au cours desquelles nous avons travaillé en partant de souches de Colibacilles préalablement identifiées, nous n'emploierons, pour les vérifications d'identité, que les caractères suivants :

Milieu lactosé au rouge neutre (décoloration, fluorescence, production de gaz);

Gélatine (pas de liquéfaction);

Méthode de GRAM (décoloration);

Recherche de l'indol (réaction positive).

Résultats expérimentaux. — Après des temps déterminés, il a été procédé à la recherche du Colibacille dans les

cultures mixtes ainsi réalisées. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

Désignation des souches utilisées pour l'établissement des cultures mixtes	EXAMEN DES CULTURES MIXTES APRÈS :							
	2 jours		4 jours		6 jours		8 jours	
	Recherche		Recherche		Recherche		Recherche	
	du Colib.	de l'Indol	du Colib.	de l'Indol	du Colib.	de l'Indol	du Colib.	de l'Indol
<i>B. subtilis</i> b + Colibacille (H)	+	+	+	+	+	+	+	+
— — (F)	+	+	+	+	+	+	+	+
— — (L)	+	+	+	+	+	+	+	+
— — (x)	+	+	+	+	+	+	+	+
— — (y)	+	+	+	+	+	+	+	+

Il ne suffit pas de constater la présence d'indol dans la culture mixte, il faut en isoler le Colibacille pour voir si la valeur de sa fonction indologène n'a pas été modifiée. Nous avons donc essayé, par action de l'acide phénique, de séparer les Colibacilles du *B. subtilis*. Malheureusement, la méthode ne nous a pas toujours permis l'isolement du Colibacille. Mais, fait important, chaque fois que l'action combinée de la chaleur et de l'acide phénique a permis l'obtention d'une souche de ces germes, nous avons toujours constaté une abondante production d'indol. Une remarque s'impose : il semblerait que le Colibacille puisse présenter une diminution de sa vitalité à la suite de son développement en présence du germe sporogène. On sait que tous les Colibacilles ne sont pas également sensibles à l'action des antiseptiques et on conçoit que certaines souches, sous l'action défavorable de la concurrence vitale, puissent devenir beaucoup plus sensibles à l'action de l'acide phénique par exemple.

Nous avons espéré tourner la difficulté en injectant les cultures mixtes à des cobayes. Nous avons, dans ce but.

injecté à deux animaux différents, des cultures mixtes de *B. subtilis* et de Colibacilles respectivement âgées de 4 et de 11 jours. Nous commuiquons ci-joints quelques-uns des résultats obtenus :

Premier cobaye. — Le premier animal a reçu en injection intrapéritonéale 3 cm³ d'une culture en eau peptonée de Colibacille (H) + *B. subtilis* (B) âgée de 4 jours. Au bout de 24 heures, par ponction du cœur et ensemencement du sang prélevé, nous obtenons une culture qui est identifiée avec le colibacille par l'ensemble de ses caractères morphologiques et cultureux. Cette souche donne une très belle réaction de l'indol (égale à 2) mais d'une intensité sensiblement identique à celle donnée par la souche, entretenue sur gélose, qui donne des réactions variant de 1-2 à 2-3.

Deuxième cobaye. — Ce deuxième animal a reçu, suivant le même procédé, 5 cm³ d'une culture de Colibacille (H) + *B. subtilis* (B) âgée de 11 jours.

Nous avons obtenu également dans ce cas une souche de Colibacilles dont les caractères étaient sensiblement les mêmes que ceux de la souche entretenue sur gélose. La souche obtenue nous donne en effet une réaction de l'indol égale à 1-2 (Echelle de GUILLERD).

En conclusion de ces recherches, nous retiendrons :

1^o La facilité avec laquelle on obtient d'emblée une souche de Colibacilles débarrassée de *B. subtilis*, en injectant la culture mixte à un cobaye.

2^o Les faits suivants : a) d'une part, le développement en commun du *B. subtilis* et du Colibacille n'entrave pas la fonction indologène de ce dernier germe; b) le passage de la souche de Colibacille (H) sur le cobaye n'a pas déterminé d'exaltation de son pouvoir indologène.

2^e Série d'essais.

Dans la première série d'expériences, le temps de contact entre le *B. subtilis* et le Colibacille est peut-être beaucoup

trop faible pour amener la destruction du Colibacille. Pour répondre à cette objection, nous avons institué l'expérience suivante :

Technique expérimentale. — Deux ballons de 2 litres reçoivent chacun 1 litre d'eau peptonée. Après stérilisation, le milieu est ensemencé avec des quantités sensiblement égales de corps microbiens de Colibacille (H) et de *B. subtilis* (B). Deux mois plus tard, la culture mixte fut soumise à un examen extrêmement attentif.

Résultats expérimentaux. — Au bout de deux mois, il est impossible de mettre en évidence du Colibacille dans cette culture mixte qui ne renferme plus alors que *B. subtilis* (B).

On sait que le *B. subtilis* secrète des diastases protéolytiques et on peut admettre que le germe sporogène a pu ainsi détruire tous les Bacilles d'ESCHERICH. Si cette hypothèse est exacte, le Colibacille devrait survivre beaucoup plus longtemps lorsque le milieu dispersif sera, non plus un milieu nutritif qui permet le développement de *B. subtilis*, mais un milieu très pauvre tel que l'eau de conduite stérilisée.

Technique expérimentale. — Afin de vérifier le bien fondé de cette hypothèse, des tubes d'eau de conduite stérilisée sont ensemencés avec du Colibacille (souche H) et du *B. subtilis* (souche L).

Les tubes sont scellés et conservés à l'obscurité pendant 5 mois.

Résultats expérimentaux. — Au bout de 5 mois, on a procédé à la recherche du Colibacille par la méthode de VINCENT. Dans tous les cas, nous avons obtenu des cultures qui ont pu être identifiées avec le Colibacille. Les réactions culturales habituelles étaient positives, le pouvoir indologène assez élevé puisque les réactions de GUILLERD étaient toutes supérieures à 3.

Dans les diverses cultures mixtes de Colibacille et de *B. subtilis* que nous avons eu l'occasion d'examiner, nous

avons toujours très peu vu de spores. Il nous a semblé qu'à âge égal des cultures où le *B. subtilis* se développait seul en renfermaient un plus grand nombre. Certains auteurs ayant prétendu que l'abaissement de la tension superficielle d'un milieu entravait la sporulation du germe qui s'y développait, nous avons effectué quelques recherches dans cette voie.

Influence possible d'un abaissement de tension superficielle du milieu de culture par le Colibacille sur la sporulation de *B. subtilis* en culture mixte.

Il s'agissait de constater la façon dont se comporterait *B. subtilis* dans un milieu favorable à son développement et dont on abaisserait la tension superficielle. Il est un certain nombre de corps qui, du fait de leur dissolution dans un liquide possèdent la propriété d'en diminuer la tension superficielle. Parmi eux le taurocholate et le glycocholate de soude sont les plus communément employés.

Ce sont ces deux dernières substances que nous avons utilisées.

Nous avons préparé successivement les milieux suivants :

I) Milieu synthétique L1 (1), additionné de 1% de taurocholate de soude = milieu A.

II) Milieu synthétique L1, additionné de 05% de taurocholate de soude = milieu B.

III) Milieu synthétique L1, additionné de 1% de glycocholate de soude = milieu C.

Dans aucun de ces milieux, nous n'avons réussi à faire

(1) Sous le nom de milieu synthétique L¹, nous entendons le milieu chimiquement défini par LASSEUR en 1911.

On sait que postérieurement le même auteur a décrit un nouveau milieu qu'il désigne par le symbole L².

Dans le chapitre VII, p. 150, nous indiquons la composition du milieu L¹.

pousser *B. subtilis*. Nous avons alors préparé les solutions suivantes :

I.	7 cm ³	de milieu L	1 + 4 cm ³	de milieu A.
II.	—	—	3 —	—
III.	—	—	2 —	—
IV.	—	—	1 —	—
V.	—	—	4 —	de milieu C.
VI.	—	—	3 —	—
VII.	—	—	2 —	—
VIII.	—	—	1 —	—

Pas plus dans ces milieux que dans les précédents, nous n'avons pu faire pousser *B. subtilis*.

Parallélisme entre le développement du Colibacille et l'abaissement de la tension superficielle du milieu de culture.

Nous avons, d'autre part, cherché à nous rendre compte :

1° Si le Colibacille pouvait provoquer un abaissement de la tension superficielle du milieu au sein duquel il se développait;

2° Ce qu'il advenait dans un milieu de culture où se développaient simultanément Colibacille et *B. subtilis*.

Des cultures ont été préparées dans le but d'effectuer des mesures de tension superficielle.

Ce sont ces mesures que M^{me} DUPAIX-LASSEUR a eu la grande obligeance d'effectuer dont nous donnons les résultats ci-dessous.

Désignation des cultures	Age des cultures	Tension superficielle des cultures en dynes/cm. à 21° C.
Milieu L ₁ nonensemencé.....		64,9
Colibacille (G).	3 jours	61,1
Colibacille (H)	—	63,0
Colibacille (Selles L)	—	64,5
Colibacille (H) + <i>B. subtilis</i> (L).	4 jours	53,7
— — —	—	54,5
— — —	—	53,2
— — —	3 jours	56,0
— — — (B).	4 jours	56,0 ³
— — — (B).	—	52,3

Conclusions. — Le développement simultané du Colibacille et du *B. subtilis* abaisse la tension superficielle au bout de 3 à 4 jours à une valeur variant de 52 à 56 dynes. Or, dans les expériences de LASSEUR et de ses Collaborateurs (année 1932), il faut abaisser la tension au voisinage de 37 dynes, pour s'opposer au développement des Bactéries sporulées. Il ne semble donc pas que la faible sporulation que nous avons observée puisse être imputée à l'abaissement de la tension superficielle.

Essai d'isolement d'un Colibacille à partir d'un intestin de tanche.

D'après BETTENCOURT et BORGES (1908), l'intestin des poissons ne renferme des colibacilles que si ces animaux ont vécu dans une eau souillée par ce germe.

A. DE MAGALHAES (1932) ne trouve pas non plus dans les fèces de poissons des Bactéries qui puissent être rangées sous la dénomination de *B. Coli communis*.

Ce fait est d'une importance capitale puisqu'il met en cause le point de doctrine relatif aux Colibacilles des animaux à sang froid; aussi avons-nous essayé d'obtenir une souche de Colibacilles issue d'un intestin de Tanche.

Technique expérimentale. — Nous nous sommes procurés des tanches que nous avons conservées pendant huit jours dans de l'eau propre afin de leur donner le temps d'expulser de leur tube digestif les matières alimentaires qu'elles avaient pu ingurgiter.

Ces tanches ont été ensuite sacrifiées. A partir du produit du raclage du tube intestinal, nous avons pratiqué la recherche du Colibacille suivant la méthode de VINCENT.

Résultats expérimentaux. — Nous n'avons pu obtenir de Colibacille.

Par contre, l'application de la méthode de VINCENT nous a permis d'obtenir une culture paraissant pure d'un germe répondant aux caractères suivants :

Eau peptonée lactosée additionnée de rouge neutre	{	Décoloration	+
		Fluorescence	+
		Gaz	—

Gélatine : liquéfaction.

Indol : réaction positive.

Examen microscopique : Bacille court, trapu, extrémités arrondies.

Coloration de GRAM : Le germe se décolore par la méthode de GRAM.

Conclusions. — Sans vouloir conclure d'une seule série de recherches négatives, notre insuccès nous fait admettre comme probable cette opinion de divers auteurs, à savoir que le Colibacille n'est pas un hôte habituel de l'intestin des vertébrés à sang froid que sont les Poissons. On ne rencontrerait, chez eux, du Colibacille que quand ils vivent dans des eaux impures où ils en absorbent fatalement.

Nous allons maintenant aborder la question de la persistance du Colibacille dans les eaux. Ce germe est un facteur important de l'appréciation des qualités d'une eau au point de vue de sa consommation. Pour cette raison, nous avons cru bon de consacrer tout d'abord quelques pages à la signification de la présence du Colibacille dans les eaux. Cette étude fera l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE IV

SIGNIFICATION DE LA PRÉSENCE DU COLIBACILLE DANS UNE EAU

Tout le monde connaît le rôle que l'on fait jouer à l'eau de boisson dans la propagation de la fièvre typhoïde; mais on sait aussi que la mise en évidence du Bacille typhique dans l'eau se heurte à de grosses difficultés.

Pour l'immense majorité des microbiologistes, il est pratiquement impossible de déceler le Bacille typhique dans une eau ayant sûrement causé la fièvre typhoïde. Il est vrai que de très rares chercheurs ont, dans quelques cas, mis en évidence le Bacille d'EBERTH, mais il s'agit là d'exceptions qui laissent toute sa généralité à la pensée admise par la plupart des auteurs : la mise en évidence du Bacille d'EBERTH dans l'eau de boisson est pratiquement impossible. Il faut cependant pouvoir porter un jugement sur l'eau destinée à l'alimentation; oui ou non, cette eau est-elle susceptible de véhiculer des germes pathogènes?

On sait que la dissémination dans l'eau de germes pathogènes tels que les Bacilles d'EBERTH se fait par l'intermédiaire des matières fécales. Puisqu'il est impossible de trouver dans l'eau le Bacille d'EBERTH, on tourne la difficulté en y recherchant un germe témoin d'une contamination par des matières fécales, en l'espèce le Colibacille. C'est la présence de ce dernier germe, en assez grandes quantités, qui, jusqu'à présent, est le principal facteur d'appréciation des qualités bactériologiques d'une eau.

Quelle valeur faut-il accorder à l'indication ainsi fournie?

Nous nous efforcerons, dans les pages qui suivent, de rassembler les principales opinions qui ont été émises à ce sujet.

Si le Colibacille fait partie de la flore habituelle du contenu intestinal où il se trouve en grand nombre, on le rencontre également dans le sol. Rares alors sont les eaux qui pourraient être livrées à la consommation s'il fallait pour cela qu'elles soient totalement dépourvues de Colibacilles. C'est pourquoi les microbiologistes se sont de bonne heure préoccupés de résoudre l'importante question de l'origine des Colibacilles trouvés dans une eau. C'est tout d'abord dans la recherche de la virulence que les auteurs ont espéré trouver l'indication de la contamination de l'eau par des matières fécales.

Nous allons voir que le facteur virulence fut assez rapidement reconnu comme incapable de fournir des données précises.

KLECKI (1895), isolant des Colibacilles d'intestins de chiens, trouve que les différentes souches obtenues sont de virulence variable.

WEISSENFELD (1900) étudie le pouvoir pathogène de différentes souches de Colibacilles isolées de l'eau. Les Colibacilles isolés de « bonnes eaux » se montraient tantôt pathogènes, tantôt non pathogènes; il en était tout à fait de même pour des Colibacilles isolés de « mauvaises eaux ». L'auteur en conclut naturellement que le fait d'isoler un Colibacille virulent d'une eau n'implique pas que cette eau soit contaminée par des matières fécales.

LARTIGAN (1902) cite plusieurs auteurs dont les résultats confirment l'opinion de WEISSENFELD. En effet, HARRIS a isolé un certain nombre de Colibacilles de selles humaines. Les souches obtenues n'étaient virulentes ni pour les cobayes ni pour les lapins. LÉVY et BRUN, par contre, attirent l'attention sur l'importance qu'il y a de déterminer la virulence du germe. D'après ces auteurs, le Colibacille typique serait virulent et si sa présence peut être démon-

trée dans une eau, c'est la preuve de sa contamination par des matières fécales.

W. SAVAGE (1903) étudie la question de savoir si l'on peut juger d'une eau par la virulence des Colibacilles qu'elle renferme. Il rapporte les opinions très divergentes émises à ce sujet: finalement, l'auteur indique que le Colibacille perd très vite sa virulence dans l'eau. Donc, si l'on trouve un Colibacille virulent, ce serait une indication de contamination récente mais pas nécessairement dangereuse.

En effet, des eaux contenant peu de Colibacilles et reconnues potables peuvent permettre l'isolement de souches de Colibacilles virulents. Un illustre bactériologiste français, M. le Professeur VINCENT, avait écrit en 1905 que « le B. Coli extrait de matières fécales est fréquemment peu ou pas virulent. Ayant néanmoins extrait un grand nombre d'échantillons de Colibacilles d'eaux de diverses natures, je les ai inoculés sous la peau de cobayes. Or, il n'a paru y avoir aucune relation entre le degré d'adulteration de ces eaux, révélé par les cultures, et la virulence du B. Coli qui en a été isolé. Telle eau, très souillée, a donné du Colibacille avirulent; telle autre, également riche en germes, possédait un bacille mortel pour le cobaye. Enfin, certaines eaux de source, bien que pures, renfermaient un B. Coli qui tuait les animaux. Aucune conclusion invariable ne peut donc être tirée des inoculations. »

L'étude de la virulence du Colibacille ne semble donc pouvoir servir de base à l'appréciation des qualités d'une eau de boisson.

William SAVAGE (1903) montre l'importance qu'il y a à considérer la provenance de l'échantillon, avant de déterminer la signification de la présence du Colibacille dans un échantillon d'eau.

En effet, les Colibacilles peuvent provenir d'excreta d'animaux paissant sur le sol et, comme le fait remarquer l'auteur, on n'a pas encore démontré qu'une contamination animale décelée par la présence de Colibacilles puisse être

nuisible. Toutefois, il faut conserver son importance à la numération du Colibacille et, dans le cas d'un nombre élevé de germes, étudier avec beaucoup de soins les conditions locales.

SAVAGE fait une distinction entre les Colibacilles provenant de l'intestin de l'homme et les Colibacilles provenant de l'intestin des animaux. Toutes réserves faites sur la valeur de cette classification, il faut remarquer que l'auteur insiste sur le point qu'une contamination par matières fécales provenant d'animaux domestiques n'a jamais donné lieu à la propagation de maladies infectieuses. Etudiant la « signification » de la présence du *B. Coli communis* dans les eaux, M. le professeur VINCENT (1905) s'exprime ainsi sur les possibilités de déterminer leur origine : « Les caractères des microbes, leur réaction plus ou moins acide, les particularités de leurs cultures, etc..., n'ont pas davantage permis de définir si un *B. Coli* appartient à une eau très souillée ou non, s'il a, ou non, une origine fécale. Cependant, les nombreuses analyses d'eau que j'ai été appelé à faire m'ont confirmé l'importance que présente la constatation de ce microbe. Pour bien saisir cette importance, il suffit de rappeler les conditions dans lesquelles s'opère naturellement l'infection des eaux potables, soit par le déversement direct ou indirect des matières fécales, d'engrais humain, de fumier, de purin, etc..., soit par celui de parcelles de terre peu souillées ou par des poussières venues de l'air.

« Dans le premier cas, le bacille venu de l'intestin de l'homme ou des animaux et retrouvé dans les eaux de boisson présente une double particularité : il y est apporté en grande quantité et il est accompagné des microbes satellites que l'on rencontre habituellement dans les déjections et les matières organiques en putréfaction.

« Au contraire, dans le second cas, c'est-à-dire lorsque l'eau a reçu des poussières ou des débris de terre non cultivée, le Colibacille n'y existe qu'en proportion toujours

faible ou insignifiante. La quantité de Colibacilles contenus dans une eau est donc en rapport avec la nature de sa souillure. Par conséquent, l'analyse bactériologique des eaux doit se préoccuper moins de la présence pure et simple du *B. Coli* que de l'abondance plus ou moins grande de ce microbe dans l'eauensemencée. »

Agueda FERREIRA, Avila HORTA et Cunha PAREDES (1908) insistent encore sur l'intérêt qu'il y aurait à distinguer le Colibacille de l'intestin de l'homme de celui des animaux (vertébrés supérieurs). Malheureusement, ils constatent, et en cela ils sont d'accord avec SAVAGE, Mac COUKEY et VINCENT, qu'il « n'y a pas à présent une manière de distinguer, par les caractères morphologiques, biologiques, biologiques et culturels, le *B. Coli* d'origine humaine de ceux de provenance animale. »

En 1908 également, BETTENCOURT et BORGES écrivent : « pour que la recherche du *B. Coli* des eaux soit un argument indiscutable en faveur de leur contamination, il faut démontrer que ce bacille habite exclusivement l'intestin de l'homme ou même des autres mammifères et des oiseaux. Qu'il n'en est pas ainsi, c'est que ce proclament les partisans de l'ubiquité du *B. Coli*. Cette bactérie se trouverait dans des eaux absolument à l'abri du plus léger soupçon, dans l'intestin des poissons, même chez les insectes, dans les céréales, dans les farines, dans la pâte de boulanger, etc... Si l'on se bornait à considérer tous ces faits d'une manière superficielle et rapide, on serait sans doute tenté d'éliminer définitivement la recherche du *B. Coli* des procédés d'étude bactériologique des eaux potables. Toutefois, en approfondissant un peu la question, on est forcé de reconnaître que, pour la plupart, ces arguments ont peu de valeur. Beaucoup de ces opinions favorables à l'ubiquité du *B. Coli* s'expliquent simplement par le fait qu'on a indûment englobé, dans le groupe du *B. Coli communis* d'ESCHERICH, plusieurs microorganismes qui n'ont de commun avec lui qu'un nombre limité de caractères morpho-

logiques et cultureux. En vérité dans la plupart des cas, il ne s'agit que d'une confusion, d'un défaut de caractérisation des bactéries du groupe du Colibacille. Mais il reste, sans doute, quelques rares cas où la présence du *B. Coli* authentique est un fait incontestable. Il ne nous semble pas cependant que l'on soit pour cela autorisé à parler d'ubiquité : nous croyons qu'on doit regarder ces cas plutôt comme des phénomènes plus ou moins accidentels et d'ailleurs explicables. En effet, rien de plus naturel et de plus compréhensible que de trouver parfois un micro-organisme, hôte habituel de l'intestin, dans les locaux, dans les objets où peuvent en quelque sorte arriver les matières fécales de dissémination relativement facile dans le milieu qui nous entoure. »

Sur 17 animaux observés, tant Poissons que Batraciens, les auteurs isolent 29 souches microbiennes, 2 d'entre elles seulement (Anguille et Serpent d'eau) présentaient l'ensemble complet des caractères typiques du Colibacille de l'intestin des Mammifères et des Oiseaux.

En conclusion, les auteurs s'expriment ainsi : « cette étude nous fait donc incliner vers l'opinion de ceux qui voient dans la présence du *B. Coli* dans l'intestin des vertébrés inférieurs un fait accidentel qui ne justifie pas que, à ce point de vue, on puisse parler d'une véritable ubiquité du *B. Coli*. »

A quelque temps de là, BETTONCOURT et BORGES publient un autre travail dont le but est de vérifier « si le phénomène de la fixation du complément permettrait de distinguer le *B. Coli communis* de l'intestin de l'homme de celui des autres mammifères et des oiseaux. »

Dans la conclusion de leurs travaux, les auteurs répondent par la négative.

En 1910, GÄRTNER montre combien les caractères des diverses formes bactériennes désignées sous le nom de *Bacterium Coli* (typique ou atypique) sont variables, puis à quel point ces Bactéries sont répandues dans la nature

et combien il est difficile de juger de la provenance (intestinale ou non) des Colibacilles trouvés dans une eau. La recherche du Colibacille doit s'accompagner de l'étude du problème de la contamination des eaux.

En 1917, GÄRTNER assure que tant que nous ne posséderons pas de moyens pour différencier les Colibacilles venant de l'homme de ceux venant des animaux, il vaut mieux agir comme s'ils venaient de l'homme.

Au sujet de l'origine des germes, l'étude topographique des lieux apporte souvent des éclaircissements.

GUILLERD (1923) pense que la présence du Colibacille dans l'eau est loin d'avoir toujours la même signification. La connaissance de l'origine définirait la grandeur du péril couru, « une eau écoulant des bacilles Colis ayant longtemps séjourné sur le sol ou dans les nappes souterraines ne représente qu'un danger amoindri, car le germe pathogène qui aura suivi la même voie de diffusion aura toutes chances d'être atténué. Par contre, une eau ne traduisant même sporadiquement qu'un faible nombre de B. Coli, mais dont l'origine sera proche et récente, représente un danger certain, car le germe pathogène qui peut l'accompagner n'aura rien perdu alors de sa virulence. »

En ce qui concerne l'origine, nous ferons remarquer que les auteurs déplacent la question sans la résoudre lorsqu'ils parlent constamment de l'origine du Colibacille. Il est bien évident que si nous étions certains qu'un Bacille Coli provient de matières fécales, nous n'aurions pas besoin de nous livrer à de nombreuses investigations pour considérer l'eau comme non potable.

En 1932, DE GRAAF fait le point de la question du Colibacille dans l'analyse bactériologique des eaux. Cette mise au point fait l'objet d'un article que nous allons nous efforcer de résumer dans les pages suivantes.

Le savant hollandais rappelle que le contenu intestinal contient une flore microbienne spéciale. Certaines espèces y sont particulièrement abondantes et s'y rencontrent

d'une façon régulière, ce sont : Colibacille, *Streptococcus*, *B. Enteritidis sporogenes*. Ces germes sont, d'après l'auteur, des microbes obligés du contenu intestinal. On trouverait, d'une façon générale et pour un gramme de fèces humaines, de 10 à 1.000 millions de Colibacilles, à peu près autant de Streptocoques et de 1 à 10 millions de *B. enteritidis*. La présence de ces germes, en grand nombre dans une eau, témoigne de façon certaine de sa contamination par des matières fécales. Dans l'étude de la signification à accorder à la présence de Colibacilles dans une eau il faut distinguer les bactéries du groupe Coli en général, du Bacille Coli fécal en particulier. Il y aurait lieu de tenir compte de l'origine d'un tel Colibacille, avant d'apprécier une eau. Malheureusement, il ne paraît pas possible actuellement de déterminer s'il vient de l'intestin de l'homme, de bestiaux ou d'animaux à sang froid. Quand on cherche à faire la lumière sur le problème posé par l'examen d'une eau potable, on doit se demander ce qu'il faut comprendre au juste par Colibacille. Depuis la découverte de ce germe par ESCHERICH dans les selles de jeunes enfants, la question ne s'est pas beaucoup éclaircie; aujourd'hui, on paraît s'accorder pour considérer, sous le nom de Colibacille, non pas une seule espèce, mais un groupe de différentes espèces très apparentées, ou même de variétés d'une ou plusieurs espèces.

Au point de vue pratique, il faut bien adopter une ligne de conduite relativement simple pour l'examen d'une eau potable. En effet, si l'on veut tenir compte de toutes les éventualités et trop approfondir les choses, les difficultés s'accumulent et l'on ne peut se former une opinion, car nos connaissances insuffisantes ne nous permettent pas de comprendre la vraie signification des Colibacilles atypiques. Puisque le but d'une analyse d'eau est de reconnaître une contamination par des matières fécales d'êtres à sang chaud, il faut nous occuper principalement du « Colibacille fécal type ». Cet organisme a été étudié suffisamment pour

être reconnu avec certitude. Il présente des qualités originales qui ont été décrites pour la plus grande partie, d'une façon excellente, par ESCHERICH.

Si les bactériologistes veulent obtenir des résultats comparables dans l'analyse d'une eau, ils doivent donc adopter des techniques bien définies et, ce qui serait très souhaitable, bien codifiées. Il faut s'en tenir, pour la détermination du germe cherché, à un certain nombre de caractères bien spécifiés. C'est d'autant plus nécessaire pour une espèce comme le Colibacille qu'il y a peu de microorganismes qui présentent une aussi grande variabilité. C'est sur ce choix de caractères essentiels que l'accord est si difficile à réaliser. Une solution satisfaisante n'est pas encore trouvée. La classification et le désir de l'ordre sont des besoins propres au chercheur scientifique. Malheureusement, le degré de perfection d'une classification est fonction du savoir humain, c'est dire combien la meilleure est imparfaite. De plus en plus, la connaissance que nous avons de formes divergentes augmente et les bases fondamentales sur lesquelles toute classification repose sont sans cesse remaniées.

DE GRAAF attire encore l'attention sur l'importance du Colibacille thermotolérant comme témoin de contamination de l'eau par des matières fécales. Ce Colibacille thermotolérant est mis en évidence par EIJKMANN en ensemençant l'eau dans les conditions suivantes :

Deux parties d'eau sont additionnées d'une partie d'une solution stérile de composition suivante :

Eau	100
Glucose	10
Peptone Witte.....	10
NaCl.....	5

L'eau à analyser additionnée de cette solution glucosée, peptonée, chlorurée, est mise à l'étuve à 45° C. pendant 24

ou 48 heures (1). Le Colibacille thermotolérant ainsi obtenu présente les caractères suivants : il est polymorphe, asporogène, se décolore par la méthode de GRAM, est faiblement mobile, anaérobie facultatif, ne liquéfie pas la gélatine, donne de l'indol, fermente le glucose, le lactose; la réaction VOGES PROSKAUER est négative.

Nous ouvrirons ici une parenthèse pour citer une note antérieure de DE GRAAF dans laquelle il expose les propriétés du Colibacille thermotolérant. Le savant hollandais a étudié les caractères de cultures d'une cinquantaine de souches de Colibacilles thermotolérants obtenus par le procédé d'FIJCKMANN en partant d'eau de canal et de fossé. Il a constaté que toutes ces souches avaient le pouvoir d'attaquer la glucose et le lactose à 45° avec production d'acide et de gaz. De plus, le pouvoir fermentatif des souches thermotolérantes a été étudié à 37°. Les souches étudiées fermentent les glucides suivants : Sorbite, Mannite, Glucose, Mannose, Galactose, avec production d'acide et de gaz. C'est seulement à l'égard de la fermentation de la glycérine et surtout de la dulcité et du saccharose que des différences sont observées. D'accord avec Mac CONKEY, DE GRAAF a pu distinguer 4 groupes :

1 ^{er} groupe	Dulcité —,	Saccharose — (19 souches).
2 ^e —	Dulcité —,	Saccharose + (3 souches).
3 ^e —	Dulcité +,	Saccharose — (15 souches).
4 ^e —	Dulcité +,	Saccharose + (13 souches).

L'auteur constate également que toutes ses souches produisent de l'indol aussi bien à 45° qu'à 37°.

(1) A propos de la culture du Colibacille à des températures élevées, nous mentionnerons les récents travaux de A. DE MAGALHAES (*Arquivos do Instituto Bact. Camara Pestana*. Tome 6, fasc. 3, 1932, et tome 7, fasc. 1, 1933). L'auteur étudie le comportement des Colibacilles cultivés à la température de 46° C. Il remarque qu'à part 2 exceptions sur 65 souches étudiées, les Colibacilles provenant d'animaux à sang froid, n'attaquent pas les sucres quand les cultures sont placées à la température de 46° C. Au contraire, placée dans les mêmes conditions, la presque totalité des Colibacilles venant de l'homme ou des animaux à sang chaud fait fermenter les sucres.

Cette parenthèse fermée, revenons à la recherche du Colibacille thermotolérant dans les eaux.

DE GRAAF nous dit que le Bacille thermotolérant est caractérisé par le « Eijkmann titer » (1). Ce titre est la plus petite quantité d'eau qui donne encore une réaction positive au glucose à 45° après 24 et 48 heures. Il est recommandé de faire comme épreuve de limite toujours cinq épreuves avec une même quantité d'eau. Pour un examen précis, on doit soumettre à l'épreuve 5 fois 100 cc d'eau (2). La lecture des résultats est faite après 24 et 48 heures. Un seul résultat positif doit faire juger l'eau mauvaise. Il n'est pas permis d'admettre la présence d'un seul Colibacille thermotolérant dans l'eau. Pour un examen ordinaire, il suffira d'opérer sur 100 cm³ d'eau.

DE GRAAF rappelle que certains auteurs ont voulu faire jouer un rôle principal à la date de contamination de l'eau par les matières fécales; lorsque les souillures seraient anciennes, il n'y aurait pas de germes pathogènes dans l'eau. Le savant hollandais doute fort que l'on puisse faire la preuve de cette supposition; son opinion est que l'âge d'une souillure fécale, considérée d'un point de vue hygiénique, a peu d'importance et que, partout où une contamination pareille est constatée, on doit considérer l'eau comme mauvaise. Il est à remarquer qu'à un point de vue pratique l'analyse bactériologique des eaux ne fournit pas de résultats absolus. Suivant la région considérée et après étude des conditions locales, il y a lieu de réserver une certaine marge d'appréciation.

(1) Pour la détermination du « Eijkmann-Titer » aussi bien que pour celle du « Coli-titer » en général, on doit examiner toute une série de quantités différentes d'eau. Le titre est alors la plus petite quantité en centimètres cubes qui donne encore une réaction positive.

Exemples :

« Coli-titer » 10, 5, 2 1/2, 1, 0,5, etc., cm³.

« Eijkmann titer » : 100, 50, 25, 10, 5, etc., cm³.

(2) Cette quantité d'eau à employer est celle employée par DE GRAAF pour l'établissement de l'« Eijkmann-titer »; elle correspond au volume d'eau que le savant juge nécessaire d'employer pour la recherche du Colibacille thermotolérant.

Quelle conclusion pouvons-nous tirer de l'ensemble des travaux que nous venons d'analyser?

Il semble bien que les facteurs d'appréciation de l'eau de boisson puissent se résumer ainsi :

1° *Détermination de la richesse de l'eau en Colibacilles.*

— Un nombre assez élevé de ces germes témoignerait de la contamination de l'eau par des matières fécales ou des produits dérivés (fumier).

2° *Recherche du Colibacille thermotolérant d'EIJKMANN.*

— Ces Bacilles seraient des témoins de contamination de l'eau par des matières fécales. Malheureusement, si l'obtention d'une telle souche paraît devoir permettre de considérer une eau comme mauvaise, le seul fait de son absence n'autorise pas à considérer l'eau comme bonne.

3° Il y a nécessité, pour apprécier la valeur relative de la contamination, de compléter l'étude bactériologique de l'eau par l'étude géographique et géologique du terrain.

Effectuée dans cet esprit et répétée un certain nombre de fois, la recherche qualitative et quantitative du Colibacille constitue un indicateur précieux de la valeur hygiénique d'une eau.

Dans le chapitre qui suit, nous allons passer en revue différents travaux qui tous ont eu pour but l'étude du sort réservé aux Colibacilles, du moment où ils ont été déversés dans les eaux.

Nous verrons, tour à tour, l'influence des multiples facteurs qui modifient la longévité de ces germes dans l'eau.

CHAPITRE V

PERSISTANCE DU COLIBACILLE DANS DES EAUX DE PROVENANCES DIVERSES FACTEURS DÉTERMINANT CETTE PERSISTANCE

L'eau sert de véhicule à une infinité de microorganismes. Comment se comportent, au sein de ce milieu, les germes microbiens et en particulier les germes pathogènes, quels sont les facteurs déterminant leurs existences respectives? Autant de questions qui ont fait l'objet de nombreux travaux.

Dès 1897, dans son *Traité de Microbiologie*, E. DUCLAUX traite longuement des différentes causes susceptibles d'entraver ou de favoriser le pullulement des Bactéries dans les eaux.

Nous relevons parmi les principaux facteurs évoqués :

1° *L'oxygène*, DUCLAUX cite les travaux de Percy FRANKLAND d'où il résulte que des échantillons d'eau, renfermés dans des tubes hermétiquement clos, voient leur population s'accroître dans de notables proportions, si l'on permet la pénétration de l'air. Il semble à Percy FRANKLAND que l'action favorable observée puisse être attribuée à l'oxygène.

2° *L'acide carbonique*. — D'après LEONCE et SOLINKE, l'acide carbonique a une action bactéricide sur les germes aérobies.

3° *La concurrence vitale*. — D'après les travaux de KRAUS, des germes comme le Bacille typhique et le Vibron cholérique disparaissent devant les bactéries saprophytes de l'eau.

4° *Les sels minéraux.* — Les travaux de FRENKMANN démontrent que des quantités même très faibles de sels minéraux augmentent dans de larges limites la multiplication des bactéries.

5° *Matériaux apportés par l'ensemencement de l'eau.* — Quand onensemence des bactéries dans de l'eau, pour y étudier la façon dont elles se comportent, il faut bien prendre garde, dit KUEPPE, de ne point apporter en même temps des fragments du milieu de culture. La présence de tels fragments, mêmes infime, peut prolonger notablement la vie des bactéries étudiées.

6° *Eau distillée.* — L'eau distillée, fait remarquer E. DUCLAUX, constitue un milieu très favorable à la conservation des bactéries.

Enfin, nous noterons également que E. DUCLAUX évoque « une substance altérable à la chaleur qui arrête le développement des bactéries. » Cette substance inconnue évoquée par E. DUCLAUX, est-elle autre chose que ce qu'on appelle le Bactériophage?

Nous trouvons donc, dès 1897, signalés dans le *Traité de Microbiologie* de E. DUCLAUX, tous les facteurs dont on a cherché depuis à établir les importances respectives.

Nous allons étudier maintenant, plus spécialement, les recherches relatives à la persistance du Colibacille dans les eaux. On sait que le *B. Coli communis* a été isolé pour la première fois par ESCHERICH des selles de nourrissons; ce germe est l'hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux. Il est de ce fait un hôte du sol et peut, en certains endroits où paissent des troupeaux, par exemple, se trouver en grande abondance.

Si, par l'intermédiaire des égouts et des eaux de ruissellement qui l'y portent, le Colibacille est trouvé fréquemment dans les eaux, il faut considérer que ces conditions d'existence sont pour lui tout à fait accidentelles. Le Colibacille ne doit pas être considéré comme un hôte normal des eaux. Par suite, le Colibacille déversé dans l'eau va

devoir vivre désormais aux côtés d'organismes placés dans des conditions optima d'existence. En conséquence de cette concurrence vitale, la persistance du Bacille Coli dans l'eau sera extrêmement variable et immédiatement apparaît l'intérêt de cette question qui a préoccupé déjà un grand nombre d'auteurs. Tous sont d'accord pour admettre la survivance temporaire du Colibacille dans l'eau, mais la discordance apparaît lorsqu'il faut estimer l'ordre de grandeur de ce temps de survivance et préciser les facteurs déterminant la disparition du Colibacille. Nous allons évoquer tout d'abord dans les pages suivantes l'action de la concurrence vitale.

Pour FRANKLAND, en 1895, le Colibacille peut vivre 40 jours dans l'eau de la Tamise. Au delà de ce délai, il est remplacé par des Bactéries saprophytes de l'eau.

Le grand bactériologiste français H. VINCENT constate la disparition, au bout d'une semaine, de Colibacilles qu'il avait ensemencés dans de l'eau de Seine. Ce savant considère que « le Colibacille ne paraît pas vivre le plus souvent dans les eaux au delà d'une à deux semaines, exceptionnellement il y persiste plus longtemps. A coup sûr, il ne s'y multiplie que dans de rares circonstances. »

Pour le professeur VINCENT, la disparition du Bacille Coli est due à une antibiose que ce microbe subit de la part des saprophytes de l'eau; de plus, il y aurait une sorte de « vaccination » de cette eau; enfin, il faudrait encore tenir compte de l'épuisement des matières nutritives qu'elle renferme.

Mac NAUGHT (1905) déclare que la survie du Colibacille dans les eaux croît avec la pureté de l'eau. Ses conclusions sont ainsi résumées un an plus tard dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur* : « La survie du Colibacille dans les eaux croît avec la pureté de l'eau. Dans des eaux stérilisées, elle dépasse toujours plusieurs mois; dans des eaux non stérilisées, elle dure de quinze jours à plusieurs mois, suivant le degré de pureté de l'eau. »

VINCENT ne se désintéresse jamais du problème de l'eau de boisson et celui à qui la science doit de si belles découvertes pose en principe, en 1918, que « la plupart des microbes pathogènes disparaissent d'autant plus rapidement d'une eau de boisson que celle-ci est plus contaminée par les Bactéries saprophytes. »

En 1919, TEISSIER et COUVREUR rapportent que l'un d'eux avait au cours d'un voyage antérieur en Russie prélevé aseptiquement des échantillons d'eaux de rivières (Volga et Oka). Ces échantillons furent conservés pendant une vingtaine d'années dans des flacons soigneusement bouchés et à l'obscurité. Après ce laps de temps, les auteurs ne trouvent plus dans leurs échantillons d'eau que quelques rares moisissures appartenant au genre *Penicillium* et du Colibacille. Ce dernier avait persisté avec tous ses caractères.

SCHAEFFER remarque, en 1923, que les grandes compagnies de navigation s'entourent de toutes sortes de précautions pour leur ravitaillement en eau potable. Mais il n'en est pas de même pour les innombrables navires de tous types qui fréquentent les ports insalubres et se ravitaillent par des moyens divers et le plus souvent dans de mauvaises conditions. L'auteur remarque que, dans un cas comme dans l'autre, les épidémies d'origine hydrique sont très rares. Ceci pour les navires de mer; pour les bateaux naviguant sur les grands lacs d'Amérique du Nord par exemple de nombreux cas de fièvre typhoïde et de diarrhée.

Or, ces deux catégories de navires, navires de mer et navires de lac ou de fleuve, ne se « distinguent que parce que les uns consomment de l'eau mauvaise nouvellement embarquée et les autres de l'eau également mauvaise mais conservée depuis plusieurs jours. Ceux qui boivent de l'eau fraîchement contaminée sont contagionnés alors que l'eau même souillée, gardée quelque temps à l'abri des pollutions récentes, est inoffensive. »

SCHAEFFER constate donc l'épuration spontanée des réservoirs d'eau des navires; après quelques considérations sur la longévité de différents germes dans l'eau, l'auteur admet qu'introduits dans de l'eau chimiquement pure et même s'ils doivent y survivre assez longtemps, les germes perdent très rapidement leur nocivité.

SCHAEFFER (1925) rappelle le procédé anglo-saxon connu sous le nom de « storage » (1) étudié en particulier par l'ingénieur anglais Houston. SCHAEFFER dit que « de l'ensemble des études auxquelles cet auteur s'est livré, il ressort que les plus fortes contaminations d'eau potable par les germes de la fièvre typhoïde ou du choléra n'ont pas survécu à une semaine de « storage ».

D'après KRUGERS-DAGNEAUX (1930), le processus de purification spontanée des eaux souillées permet de classer les Colibacilles en 4 groupes :

		Glucose 37°	Lactose 37°	Eijkmann 45°
Groupe I		—	—	—
— II		+	+	+
— III		+	+	—
— IV		+	—	—
		+	—	+

Les germes du groupe I, représentant le Colibacille type, disparaissent les premiers, au cours de l'auto-épuration. Les germes des groupes II, III, et IV subsistent sensiblement plus longtemps.

Si, au contraire, on étudie séparément la persistance de chacun de ces groupes de germes dans de l'eau stérilisée (2), on constate que ce sont les bacilles des groupes II et III qui meurent le plus vite; ceux du groupe IV se montrent un peu plus résistants et enfin ce sont ceux du groupe I qui subsistent le plus longtemps. Il est surprenant de constater que, contrairement à ce qui se passe dans l'eau

(1) Emmagasinement.

(2) A la température du laboratoire.

naturelle, si on mélange les groupes dans l'eau stérilisée, ce dernier ordre de disparition est conservé.

KRUGERS-DAGNEAUX fait également remarquer que le séjour dans l'eau stérile et le contact de ces 4 types de Colibacilles détermine quelques modifications des propriétés physiologiques de ces germes. Toutefois, on n'observe pas de passage d'un groupe à l'autre.

ROCHAIX et URTINETTE (1931) étudient des échantillons de provenances diverses et renfermant des bactéries putrides. Pour ces savants, « on rencontre dans les eaux manifestement souillées des microbes paraissant appartenir aux espèces les plus variées mais présentant des réactions biologiques communes, d'origine suspecte, en particulier dégageant aux dépens des matières albuminoïdes du milieu de l'hydrogène sulfuré et du sulfhydrate d'ammoniaque. Ce sont les bactéries putrides. Les espèces qui produisent ces gaz malodorants se rencontrent chaque fois que l'on introduit des contaminations fécales dans l'eau et constituent donc un élément très significatif de pollution.

« Or, il semble que la présence des Bactéries putrides dans l'eau gêne la persistance du Colibacille, microbe lui aussi d'origine fécale, ou contribue à sa disparition plus ou moins rapide ou complète.

« Nous avons eu l'occasion d'examiner 15 échantillons d'eau de provenances diverses, renfermant des bactéries putrides, au point de vue de la présence concomitante du Colibacille et nous sommes arrivés aux résultats suivants : dans deux cas seulement où l'eau renfermait des Bactéries putrides, le Colibacille s'y trouvait en proportion élevée (500 à 2.500 Colis au litre); dans tous les autres cas (80 %), il était absent ou ne s'y trouvait que dans une faible proportion».

Les auteurs se sont demandés si le dégagement d'acide sulfhydrique ne pouvait être cause de cette action empêchante vis-à-vis du Colibacille? Mais, dans un mémoire important paru la même année, DOURIS et BECK ont

démontré que l'acide sulfhydrique ne pourrait être mis en cause puisque le Colibacille se trouve être parmi les espèces les plus résistantes à son action.

Dans les travaux que nous venons de signaler, on peut invoquer l'action de la concurrence vitale ou de la présence de matières organiques, en plus ou moins grandes quantités, pour expliquer la disparition du Colibacille.

Dans ces dix dernières années, c'est principalement à l'étude du Bactériophage qu'ont été consacrées les recherches sur la disparition des germes pathogènes dans l'eau.

Les travaux dont nous allons exposer les résultats au cours des pages suivantes attribuent à un Bactériophage la disparition ou tout au moins la diminution du nombre des Colibacilles.

Fernand ARLOING et SEMPÉ (1924) rapportent que « la présence de propriétés bactéricides a été démontrée dans certaines eaux fluviales, en particulier dans celles de la Jumma et du Gange, par HANKIN, pour le vibron cholérique. »

Les auteurs remarquent que les eaux du Rhône et de la Saône possèdent indiscutablement des propriétés « empêchantes » à l'égard des Bactéries du groupe du Colibacille, du Bacille typhique et du Bacille dysentérique. Les Colibacilles se sont montrés particulièrement sensibles. La substance « empêchante » est un principe lytique.

FABRY (1928) parle du bactériophage, dans les eaux alimentaires. « Ce principe aurait-il, par exemple, la propriété de détruire les germes comme le Colibacille, ou simplement de le masquer par une lyse suivie de réapparition de formes microbiennes typiques? D'autre part, la présence du bactériophage dans une eau ne montrerait-elle pas que si cette eau véhicule un principe filtrant, elle pourrait aussi transporter des formes filtrantes de microbes pathogènes? »

Fabry étudie 32 échantillons d'eau, il trouve :

- 15 fois ni Colibacille ni Bactériophage;
- 13 fois du Colibacille et du Bactériophage;
- 2 fois du Colibacille seul.
- 2 fois du Bactériophage sans Colibacille.

L'auteur ne conclut à l'absence de Bactériophage qu'après trois ou quatre filtrations successives du bouillonensemencé avec des microbes lysables. Les germes utilisés étaient le Colibacille et le Bacille de Shiga, tous deux très aisément lysables et reconnus comme non lysogènes.

Les conclusions de l'auteur sont les suivantes :

« Si on admet que la présence du Colibacille dans une eau doit faire considérer celle-ci comme suspecte, l'absence de Colibacille ou d'autres microbes intestinaux ne prouve pas d'une manière absolue que cette eau n'est pas polluée (le nombre des microbes, quand il est abondant, est toujours une raison de suspecter une eau). Le Colibacille présent dans les eaux peut fort bien y avoir été lysé par le bactériophage et ne plus être retrouvé par la technique ordinaire. Les formes filtrantes de microbes pathogènes pourraient tout aussi bien que le bactériophage passer à travers les terrains de filtration des eaux, mais il resterait à déterminer à partir de quelle épaisseur de terrains les microbes filtrants ne passent plus.

« La recherche du bactériophage dans une eau pourrait peut-être faire suspecter la pollution de cette eau, puisque le bactériophage provient du milieu intestinal. »

Guglielmo Fiume (1930) étudie la flore des boues.

Les observations effectuées au cours de cette étude conduisent l'auteur à la mise en évidence dans les boues de principes destructeurs qui ont montré leur action dissolutrice sur certains germes intestinaux et précisément sur le Colibacille.

Les expériences eurent lieu du mois de juin au mois de septembre; elles furent effectuées de la façon suivante :

Sur des filtres constitués de plusieurs couches de sable

(grains de différentes dimensions), on étend la boue puis on verse doucement de l'eau (eau de puits dont l'analyse bactériologique avait révélé la présence de différentes sarcines, de *B. arborescens*, de *B. Zopfi*, de *B. proteus*.)

Le Colibacille fut employé pour souiller l'eau pour la recherche des principes de destruction.

On observe la disparition des Bactéries au moment où la superficie des boues se couvre d'une couche d'algues monocellulaires riches en chlorophylle, dans la réticule desquelles a lieu une vie très intense de Protozoaires ciliés, phagocytes de microbes. L'épuration est complète lorsque cette faune est remplacée par une riche flore bactérienne minéralisatrice.

C'est alors qu'apparaissent dans l'eau qui est passée à travers la couche de boue les « principes lysants » du Colibacille. Cette action marque l'étape finale du pouvoir auto-épurateur des boues.

Oddo CASAGRANDE, en 1930, découvre dans les eaux potables des granulations qui déterminent la destruction des cellules bactériennes. Ces granulations sont douées de motilité et leur action destructive cesse avec la perte de cette motilité. Les phénomènes de destruction des corps microbiens sont liés à la pénétration ou à l'absorption des granulations par la plastide bactérienne.

Toutes les eaux ne possèdent pas les mêmes granulations et la qualité des granulations qu'elles contiennent confère à chacune d'elles un caractère particulier. Oddo CASAGRANDE observe, au microscope, dans l'eau de *S. Pellegrina*, la destruction presque immédiate de cellules bactériennes sous l'action des granulations.

L'auteur fait d'autre part allusion à l'action « biobactério-activatrice » de DENES que certaines eaux possèdent ou sont susceptibles d'acquérir. Cette action se manifesterait en favorisant dans certaines conditions le pullulement des bactéries dans une eau. DENES a étudié à ce sujet le Colibacille. Du fait de l'apparition de cette propriété,

il deviendrait possible d'isoler des Colibacilles d'une eau dans laquelle on n'en pouvait primitivement trouver.

ARLOING et DUFOURT, en 1931, étudiant l'auto-épuration colibacillaire des eaux fluviales, constatent qu'il est fréquent de voir des eaux ayant 200.000 Colibacilles le jour de leur prélèvement dans le Rhône tomber à 2.000 Colibacilles et au-dessous en un mois environ.

Les auteurs ont réalisé l'expérience suivante : trois ballons reçoivent chacun une quantité déterminée d'une eau de même provenance, mais ayant subi des traitements différents. Le premier ballon a reçu de l'eau à son état naturel, le deuxième de l'eau filtrée sur bougie Chamberland 13, le troisième ballon enfin de l'eau filtrée et chauffée à 120°.

Les ballons sont ensuiteensemencés chacun à raison de 200.000 de Colis au litre. ARLOING et DUFOURT retrouvent au bout de trois mois :

1.000	Colibacilles dans le ballon n°	1	(1);
2.000	—	—	2;
4.000	—	—	3.

Les auteurs concluent à l'existence d'un principe lytique ayant été détruit, par chauffage, dans le ballon n° 3. Le principe lytique se révèle incapable de détruire tous les Colibacilles; ARLOING et DUFOURT observent à partir d'un certain degré d'épuration la persistance d'un nombre de Colibacilles qui ne diminue plus et se fixe généralement autour de 1.000 à 2.000 par litre. Les auteurs ajoutent que ces Colibacilles sont devenus résistants au principe lytique.

(1) Dans cette expérience le milieu utilisé pour la recherche du Colibacille est le milieu bien connu de DIENERT et ETRILLARD (1929). Ce milieu nous a donné des résultats très satisfaisants.

A propos de l'usage des milieux contenant des colorants (virage), nous tenons à signaler le mémoire de ULRICO DI AICHELBURG (1932). Après de nombreux essais l'auteur préconise l'emploi du milieu de Dominick-Lauter pour la recherche du Colibacille. La méthode serait particulièrement sensible et permettrait de déceler les Colibacilles dans des eaux n'en renfermant qu'un nombre minime.

D'autre part, ils constatent l'abaissement plus rapide du taux en Colibacilles, pour des échantillons d'eau conservés à la lumière, que pour des échantillons conservés à l'obscurité. « Le facteur d'épuration lumière doit donc être considéré comme réel, mais il n'est pas le plus important. L'auto-épuration dépend surtout, en premier lieu, de la concurrence vitale, en second lieu de l'action d'un principe lytique, en troisième lieu de l'appauvrissement nutritif du milieu ».

Dans une note ultérieure, ARLOING et DUFOURT recherchent les effets de la concurrence vitale sur la disparition des Colibacilles de l'eau, dans l'eau du Rhône. Ils avaient remarqué que dans une eau très riche en germes (Rhône), les Colibacilles disparaissent plus rapidement que dans une eau moins riche provenant d'un puits filtrant. Les auteurs ont isolé un certain nombre de germes de l'eau qui ne semblaient avoir qu'une faible action sur l'auto-épuration colibacillaire. Dans ces recherches, les savants observent de petits Cocci répondant aux caractères suivants :

« Semis à peine perceptible sur gélose, très fin et incolore sur gélatine qui n'était pas liquéfiée; milieux sucrés attaqués, sauf le lactose; bouillon au rouge neutre non modifié; culture à peine visible en bouillon de bœuf, sans voile ni dépôt. » Ce germe, transporté dans une eau filtrée, stérile, y subsistait pendant de longs mois. Il s'est révélé comme ayant un pouvoir remarquablement destructeur vis-à-vis des Colibacilles. En effet, ARLOING et DUFOURT avaientensemencé simultanément, avec du Colibacille, deux flacons de 100 cm³ renfermant de l'eau du Rhône filtrée, de façon à avoir une eau polluée à 200.000 Colibacilles par litre. Un des deux flacons avait de plus reçu une trace de culture sur gélose des Cocci en question.

Au bout d'un mois, les auteurs retrouvent 500 Colibacilles vivants dans le flacon ayant reçu en plus des Colibacilles une trace de culture des Cocci ci-dessus; le

flacon contenant seulement des Colibacilles donne encore 20.000 Colibacilles vivants.

Ces mêmes auteurs montrent que l'auto-épuration est également en rapport avec la richesse des eaux en matières nutritives. Ils s'adressent pour cette démonstration à de l'eau du Rhône après qu'elle se soit spontanément épurée jusqu'à la concentration de 2.000 Colibacilles au litre.

Une partie de cette eau, mise dans un flacon, reçoit six gouttes d'eau peptonée. ARLOING et DUFOURT donnent les résultats suivants de leur expérience :

Résultats expérimentaux.

Dates des prélèvements	Nombre de germes vivants (Chiffres rapportés au litre)
27 novembre	2.000
29 —	5.000
3 décembre	40.000
9 —	200.000
17 —	200.000
24 —	100.000
5 janvier	75.000
15 —	60.000
27 —	40.000
15 février	20.000
1 ^{er} mars	2.000
15 —	2.000

En 1931, F. ARLOING et DUFOURT et Pierre-Étienne MARTIN exposent une étude dont le but a été d'étudier l'influence de la valeur du pH des eaux fluviales sur l'épuration colibacillaire. « D'après nos constatations, disent ces auteurs, le pH des échantillons d'eau prélevés dans le Rhône, dosé d'après la méthode colorimétrique a varié de 7 à 7,8. »

Les auteurs ont institué deux séries d'expériences avec deux échantillons d'eau du Rhône. Dans la première série, un flacon reçoit l'eau naturelle qui se trouve à pH 7. Un

deuxième flacon reçoit la même eau mais amenée à pH 8,2, un troisième flacon enfin reçoit de l'eau amenée à pH 6.

Dans la deuxième série, trois flacons sont également préparés, le premier reçoit l'eau naturelle qui se trouve à pH 7,8, les deux autres flacons reçoivent respectivement de l'eau amenée à pH 6 et 5,2.

Les auteurs effectuent périodiquement des numérations de Colibacilles à partir des flacons en question. Leurs conclusions sont les suivantes : « Il résulte de ces dosages que des variations de pH de l'ordre de celles que nous avons utilisées n'influencent pas d'une façon bien appréciable l'auto-épuration colibacillaire des eaux fluviales.

« Il semblerait *a priori* que l'abaissement du pH dut hâter la disparition du Colibacille. Mais nous avons mis en lumière dans des notes antérieures la complexité très grande des facteurs d'auto-épuration. Il n'est pas douteux que si l'acidification de l'eau est biologiquement défavorable au Colibacille, elle gêne également les phénomènes de concurrence vitale entre germes et l'action du principe lytique. Finalement, l'auto-épuration est restée dans tous les cas, à peu de choses près, identique à elle-même, tout au moins dans les conditions où nous avons expérimenté. »

Un savant hollandais J. SMIT, en 1931, remarque que l'action d'un « Coliphage » ne provoque la disparition des Colibacilles que si le nombre de ceux-ci est élevé (plus de 100.000 par centimètre cube).

En 1932, DE VAGEDES publie un travail sur le Coliphage. Il rappelle différents travaux entre autres ceux de FABRY, NYBERG, GILDEMEISTER et WATANABE qui ont isolé de certaines eaux des bactériophages exerçant leur action lytique sur les Colibacilles.

DE VAGEDES se demande si la mise en évidence dans une eau d'un bactériophage actif pour le Colibacille peut donner des indications utiles dans l'appréciation des qualités hygiéniques de l'eau. Pour cela, l'auteur a recherché le Coliphage dans 58 échantillons d'eaux. Dans ces essais, la

recherche du Coliphage selon le procédé de NYBERG (1) n'est positive que 42 fois. Les eaux examinées étaient pourtant toutes souillées par des matières fécales.

Aussi DE VAGEDES déclare-t-il, et en cela il est d'accord avec FABRY, NYBERG, GILDEMEISTER et WATANABE, que la présence du Coliphage indique une contamination de l'eau. L'absence de Coliphage, par contre, ne permet pas de conclure à la pureté de l'eau.

M. le Dr HANDUROY, auquel nous avons été demander conseil, a bien voulu nous donner son opinion sur l'influence possible du Bactériophage sur la persistance des Bactéries pathogènes dans les eaux. Il y a lieu de distinguer ce qui se passe dans la nature de ce qui se passe lorsqu'on expérimente au laboratoire. Dans ce dernier cas l'influence d'un Bactériophage sur la disparition d'une espèce microbienne déterminée peut être prépondérante. Il n'en est vraisemblablement pas de même dans la nature nous a dit le Dr HANDUROY qui estime alors que l'action d'un Bactériophage n'est pas à retenir pour expliquer la disparition de l'espèce microbienne considérée.

De nombreux travaux ont été faits qui étudient la disparition plus ou moins rapide des bactéries dans l'eau, suivant sa composition chimique. Malheureusement, il est assez rare de voir ces recherches, s'adresser au Colibacille. Ainsi qu'en témoignent les travaux de FREUDEREICH, le comportement du Colibacille dans une eau est, dans une certaine mesure, en relation avec sa richesse en matières organiques.

En 1896, FREUDEREICH ensemence des Colibacilles de provenances diverses (eau de fontaine, eau de conduite, intestin) dans de l'eau stérilisée provenant de la conduite d'eau de son laboratoire et il suit la variation du nombre des plastides de Colibacilles ensemencés. Les résultats obtenus sont variables. Toutefois, d'une façon générale,

(1) *Zent. für Bakt.*, t. 122, 1931^e p. 270-276.

il y a accroissement du nombre des germes pendant les premiers jours qui suivent l'ensemencement.

Avec l'eau de l'Aar, FREUDEREICH a constaté un accroissement beaucoup plus important du nombre des Colibacilles que dans les expériences qu'il avait faites précédemment avec l'eau de conduite de son laboratoire. Il est à remarquer que, du fait de pluies torrentielles, ces eaux étaient très chargées de matières organiques.

Dans une autre série d'expériences faites avec des eaux non stérilisées, FREUDEREICH remarque une disparition rapide du Colibacille pour des eaux pauvres en matières organiques, alors que, pour des eaux également riches en Bactéries saprophytes mais plus riches en matières organiques, le Colibacille résiste beaucoup mieux.

Certaines eaux paraissent posséder une constitution chimique particulièrement favorable au développement du Colibacille. GABBANO (1928) dit à propos des eaux magnésiennes de Montecatini qu'elles sont d'une très grande pureté à leur sortie du sol. Cependant des Colibacilles ont été décelées en assez grand nombre après la mise en bouteilles. Nous extrayons les lignes suivantes du *Bulletin de l'Office international d'hygiène publique* où l'ouvrage est analysé : « des Colibacilles introduits en très petits nombre (10 à 20 par cm³), à la température de 22°, il se produit une multiplication rapide et très grande, malgré la présence en même temps de germes microbiens banaux. »

En 1931, J. SMIT rapporte les travaux effectués à son laboratoire. Un de ses collaborateurs JOUGBLOED a étudié la disparition de *B. Coli communis* isolé de fèces dans trois sortes d'eaux :

- 1° L'eau de conduite qui est distribuée à Amsterdam;
- 2° L'eau des canaux d'Amsterdam;
- 3° L'eau d'une pièce d'eau voisine du laboratoire.

L'auteur a observé que les Colibacilles ne vivaient pas un temps égal dans chacun des trois échantillons d'eau considérés. Il se demande si l'action de la composition

chimique de l'eau est capitale. Pour résoudre cette hypothèse, JOUGBLOED prépare une eau de composition chimique aussi voisine que possible de l'eau de canal dont il avait usé pour ses expériences. Les courbes de disparition des Colibacilles obtenues avec cette eau synthétique se montrent en tous points comparables à celles obtenues avec l'eau du canal elle-même. Les courbes de disparition des Colibacilles établies montrent que la mort des germes est très variable; elle est d'autant plus lente que le degré de souillure chimique de l'eau est plus marqué. Dans l'eau la plus souillée (pièce d'eau), les germes vivent le plus longtemps, alors que l'eau de conduite offre les conditions les plus défavorables à leur existence. L'auteur conclut que la vitesse de disparition des Colibacilles dans l'eau stérilisée peut être expliquée uniquement par les conditions chimiques, en particulier l'action des ions.

D'autre part, JOUGBLOED remarque une action retardative de CO_2 sur la disparition du Colibacille. Cette action se fait sentir seulement au début de la dissolution de ce gaz dans l'eau du ballon de culture. Le fait s'explique par la constatation suivante : au bout de 35 jours, l'eau dans laquelle on a fait dissoudre du CO_2 (90 milligr. au litre) n'en contient pas plus que l'eau ordinaire (21 à 24 milligr. au litre). Le changement de la quantité de CO_2 dissous dans de l'eau d'un ballon stérile ne fut pas constaté; ce changement doit donc être attribué à l'action des Bactéries.

L'auteur essaye l'action des bicarbonates, peptones, urates, nitrates, sels d'ammonium. Toutes ces substances, sauf les nitrates, eurent une influence favorable sur la persistance des Bactéries. Notamment l'addition de peptone (100 milligr. au litre) amena une augmentation du nombre des bactéries. Cette addition de peptone permit la survie des Bactéries au delà de 70 jours, alors que sans peptone elle ne dépasse pas 10 jours. Le résultat était d'ailleurs attendu.

Dans certaines conditions, l'action bactéricide des Pro-

tozoaires doit être prise en considération. Otto DE HUNTEMÜLLER (1906) constate dans des eaux où se développaient un grand nombre de Protozoaires une baisse rapide du taux des Bactéries. Les Protozoaires observés englobaient et digéraient un grand nombre de microbes. Aussi l'auteur a-t-il attribué aux Protozoaires la disparition rapide des Bacilles typhiques qu'il ajoutait à l'eau. Il a parfois observé une disparition totale en 48 heures, alors que, dans une eau stérilisée dépourvue de Protozoaires, il faut une vingtaine de jours pour la disparition des Bacilles d'EBERTH.

Wibaut ISEBREE MOENS (1927) remarque combien rares sont les épidémies gastro-intestinales à bord des grands vapeurs où l'eau est emmagasinée dans des grandes citernes, l'auteur trouve dans ces réservoirs des quantités importantes de Protozoaires. Nous relevons ces quelques lignes dans le *Bulletin de l'Office international d'hygiène publique* où le travail est analysé : « L'examen des prélèvements des réservoirs de deux navires montrèrent que les Protozoaires provoquaient pratiquement, dans une eau mise en observation pendant quinze jours, la disparition de toutes les Bactéries. Dans ces deux cas, on trouva beaucoup de Protozoaires bactériophages : *Cyclidium glaucoma*, *Glaucoma scintillans*. »

DMITREVSKAÏA (1930) étudie les rapport réciproques de *Protozoa Paramaecium caudatum* et du vibrion cholérique. L'auteur confirme le fait de l'absorption des microbes par les Protozoaires, mais les résultats sont variables quant à la destruction complète des bactéries. L'activité vitale des Protozoaires dépend beaucoup du milieu ambiant.

Guglielmo FIUME (1930) signale l'action importante des Protozoaires ciliés en tant que phagocytes des microbes. J. SMIT (1931) observe l'action bactéricide de *Cyclidium Glaucoma*. En moins de 5 jours, la population microbienne d'un échantillon d'eau (contenant 6 millions de germes au cm^3) est ramenée au voisinage de zéro.

Nous avons personnellement observé, dans une expé-

rience au cours de laquelle des Colibacilles ont rapidement disparu de l'eau où nous les avions déversés (1), la présence simultanée de nombreux infusoires (en particulier des hypotriches). Sans avoir l'intention d'attribuer à ces seuls organismes la disparition des Colibacilles ajoutés à l'eau, on peut vraisemblablement penser qu'ils y ont largement contribué.

(1) Voir expériences I et II, p. 104 et 107.

CHAPITRE VI

PERSISTANCE DU COLIBACILLE DANS DIVERSES EAUX

(Recherches personnelles).

Dans les recherches que nous venons de résumer, nous avons vu comment l'addition de traces d'une substance nutritive pouvait prolonger dans l'eau l'existence d'une population bactérienne.

Nous avons pensé qu'à l'égal d'autres germes étudiés le Colibacille devait subsister moins longtemps dans de l'eau distillée stérile que dans de l'eau de conduite stérile. Une telle eau contient, en effet, un certain nombre de sels dissous ainsi qu'une petite quantité de matières organiques. C'est pour cela que nous avons étudié comparativement la persistance du Colibacille dans ces deux catégories de liquides stériles.

Expérience I (1^{re} série).

Technique expérimentale. — Dans des séries de tubes *a*, *b*, *c*, *d* et *a1*, *b1*, *c1*, *d1*, on distribue respectivement dans chacun des tubes de la première série 20 cm³ d'eau distillée, dans chacun des tubes de la seconde série 20 cm³ d'eau de conduite stérile. Les deux séries de tubes sont bouchées et stérilisées. Après stérilisation et refroidissement, on dépose dans chaque tube la valeur d'une anse de platine de corps microbiens provenant de cultures effectuées sur gélose peptone (1). Les précautions sont prises

(1) Les cultures étaient âgées de 48 heures.

pour réaliser une répartition aussi régulière que possible des corps microbiens dans le liquide dispersif. Les tubes bouchés et capuchonnés furent placés dans une armoire à la température du laboratoire durant 17 mois.

Résultats expérimentaux. — Au bout de ce laps de temps, nous avons procédé à la numération des Bactéries contenues dans l'eau par ensemencement sur boîtes de PÉTRI. Les résultats obtenus sont consignés dans les deux tableaux suivants :

I^{re} Série.

SÉJOUR DES COLIBACILLES DANS L'EAU DISTILLÉE STÉRILISÉE.

Souches utilisées		Germes vivants (après 17 mois)
Colibacilles	(selles L)	0
—	(Loire II)	0
—	(x)	0
—	(H)	0

II^e Série. — SÉJOUR DES COLIBACILLES DANS L'EAU
DE CONDUITE STÉRILISÉE

Souches utilisées		Germes vivants (après 17 mois)
Colibacilles	(selles L)	2.280.000 (au litre).
—	(Loire II)	928.000 —
—	(x)	500.000 —
—	(H)	4.000 —

Afin de s'assurer que les colonies ne provenaient pas d'une contamination mais avaient bien pour origine une plastide de Colibacille, chaque colonie a été ensemencée sur les milieux que nous avons indiqués précédemment. Ainsi qu'il fallait s'y attendre, l'eau distillée est donc nettement plus bactéricide que l'eau de conduite.

En présence de ces faits, nous avons étudié l'action comparative d'une eau de puits stérile et de l'eau de conduite.

Expérience II.

Technique expérimentale. — Le protocole est celui de la première expérience, mais le temps de contact avec l'eau n'a été réalisé que durant 5 mois.

Résultats expérimentaux. — Les résultats obtenus sont consignés dans les deux tableaux suivants :

I^{re} Série. — SÉJOUR DES COLIBACILLES DANS L'EAU
DE PUIITS STÉRILISÉE

	Souches utilisées	Germes vivants (après 5 mois)
Colibacilles	(conserves)	0
—	(selles I. P.)	0
—	(selles L)	0

II^e Série. — SÉJOUR DES COLIBACILLES DANS L'EAU
DE CONDUITE STÉRILISÉE

	Souches utilisées	Germes vivants (après 5 mois)
Colibacilles	(conserves)	> 35.000 (au litre).
—	(selles I. P.)	35.000 —
—	(selles L)	35.000 —

L'identité des souches obtenues à partir des tubes d'eau de conduite est vérifiée par passage sur les milieux habituels.

La persistance plus grande du Colibacille dans l'eau de conduite laissait supposer que non seulement la pression osmotique mais surtout la matière organique, en bien plus

grande quantité dans l'eau de conduite que dans l'eau de puits, permettait au Colibacille de persister de longs mois au contact du liquide étudié. Si la matière organique jouait un rôle dans cette persistance du germe d'ESCHERICH, il devait être possible d'obtenir le même résultat en ajoutant à l'eau distillée de faibles quantités de matières organiques de l'Asparagine par exemple. C'est ce qui fait l'objet de notre troisième expérience.

Expérience III.

Technique expérimentale. — Un ballon de 200 cm³ contenant une solution d'Asparagine à 1 % dans de l'eau distillée est ensemencé avec une anse de culture sur gélose de Colibacille (selles L) âgée de 48 heures.

Résultats expérimentaux. — Après 20 mois de séjour dans une armoire obscure à la température du laboratoire, une numération des germes effectuée donne 560.000 germes vivants (chiffres rapportés au litre).

Une vérification d'identité des colonies obtenues est effectuée par passages sur les milieux habituels.

Pour le but que nous poursuivons, il est intéressant de voir si des germes récemment isolés de selles offrent une résistance différente de celle des souches entretenues depuis des mois ou de longues années dans les conditions des laboratoires. C'est ce qui justifie notre quatrième expérience réalisée avec un Colibacille isolé depuis quelques jours de l'intestin de l'homme.

Expérience IV.

Technique expérimentale. — Un ballon de deux litres rempli d'eau de conduite stérilisée est ensemencé avec une anse de culture sur gélose de Colibacilles (1) âgés de 48 heures.

(1) Il s'agit d'une culture de Colibacilles récemment isolés de selles humaines.

Résultats expérimentaux. — Au bout de trois mois impossibilité d'isoler un Colibacille de l'eau alors qu'un mois auparavant elle contenait encore des Colibacilles vivants.

En présence de ces faits, nous nous sommes demandés s'il n'était pas intéressant de souiller l'eau, non plus avec une culture de Colibacilles récemment isolés des matières fécales, mais bien avec des matières fécales elles-mêmes, c'est-à-dire avec l'ensemble de la flore du tube intestinal.

C'est ce qui fait l'objet de notre cinquième expérience.

Expérience V.

Technique expérimentale. — Un litre d'eau de conduite est contaminé avec une petite quantité de selles (1).

Le ballon est enfermé dans une armoire obscure à la température du laboratoire.

Résultats expérimentaux. — Des prélèvements effectués au bout de 2, 3 et 4 mois (2), nous permettent l'isolement de souches de Colibacilles. Après le cinquième mois, il devient impossible d'isoler un Colibacille.

En présence des divergences des résultats obtenus dans les expériences IV et V, nous avons été conduits à associer aux Colibacilles d'autres germes.

Nous avons choisi pour cela un Staphylocoque et une Sarcine pour la double raison que ce sont des germes très répandus et faciles à distinguer du Colibacille à l'examen microscopique.

Expérience VI.

Technique expérimentale. — La technique utilisée est celle des autres expériences à cette différence près que l'eau reçoit une anse de culture de Colibacilles plus une anse de culture de l'un des Cocci considérés.

(1) Simultanément, nous avons isolé de ces selles un Colibacille.

(2) Les prélèvements effectués à la fin du 4^e mois donnent 50 Colibacilles au litre.

Résultats expérimentaux. — Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

Désignation des mélanges de germes ensemencés dans l'eau de conduite stérile	Durée de persistance du Colibacille
Colibacille (x) + Staphylocoque.....	538 jours.
Colibacille (y) + Sarcine	142 —
Colibacille (y) + Staphylocoque.....	145 —
Colibacille (y) + Sarcine	379 —
Colibacille (Loire II) + Staphylocoque.....	538 —
Colibacille (Loire II) + Sarcine.....	379 —
Colibacille (selles L) + Staphylocoque.....	379 —
Colibacille (selles L) + Sarcine.....	538 —

Nous avons pu constater, à la lecture des résultats de l'expérience n° 1, l'écart existant entre le chiffre des germes vivants de Colibacille (selles L) et celui des germes vivants de Colibacille (H). Dans le désir de voir si cet écart une fois observé correspondait réellement à une capacité de résistance différente des deux souches, nous avons réalisé les deux expériences suivantes :

Expérience VII.

Technique expérimentale. — Deux tubes contenant chacun 10 cm³ d'eau de conduite stérilisée sont respectivement ensemencés, l'un avec une anse de culture sur gélose de Colibacille H, l'autre de Colibacille selles L (cultures âgées de 48 heures).

Ces tubes sont scellés et conservés pendant un an à l'abri de la lumière et à la température ordinaire.

Résultats expérimentaux. — Après un an, les tubes sont ouverts et une numération des germes vivants effectuée.

Souches utilisées	Germes vivants chiffres rapportés au litre
Colibacille (selles L)	1.800.000
Colibacille (H)	2.000

Expérience VIII.

Technique expérimentale. — Deux tubes contenant de l'eau de conduite stérilisée sontensemencés respectivement, l'un avec le Colibacille (H) et le Staphylocoque, l'autre avec le Colibacille selles et le Staphylocoque (une anse de culture sur gélose âgée de 48 heures).

Les tubes sont ensuite scellés et abandonnés à la température ordinaire et à l'abri de la lumière (expérience A).

A quelques jours d'intervalle, deux tubes sont à nouveau préparés de façon identique (expérience B).

Résultats expérimentaux. — Au bout de six mois, on ne trouve plus de Staphylocoques vivants. La numération des Colibacilles vivants effectuée donne respectivement les chiffres suivants rapportés au litre :

Expérience A		Expérience B	
Colibacille (H).....	1.980	Colibacille (H) ..	610.000
Colibacille selles ...	4.368	Colibacille selles..	2.260.000

En conclusion de ces deux expériences, il semble ressortir nettement que le Colibacille (variété selles L) a une résistance plus grande que le Colibacille (variété H) à l'action combinée de l'eau et de la concurrence vitale (Staphylocoque).

Les expériences que nous venons de relater, même dans les essais utilisant une association Colibacille-*B. subtilis*, Colibacille-Staphylocoque et Colibacille-Sarcine, ces expériences, disons-nous, sont loin de réaliser une complication aussi grande que celle que l'on observe dans la nature. Aussi avons-nous cherché à nous placer dans des circonstances qui se rapprochent le plus possible des conditions naturelles.

Pour cela, nous avons tout d'abord utilisé un bac en verre de 0^m 45 de longueur sur 0^m 25 de largeur et 0^m 25 de hauteur. Ce bac avait reçu une couche de terre mêlée

de sable d'une hauteur d'environ 3 cm, le tout étant recouvert d'une couche de sable d'égale épaisseur. Dans le sol artificiel ainsi réalisé, nous avons planté plusieurs pieds de plantes aquatiques. Les espèces suivantes étaient représentées : *Myriophyllum* (Haloragées), *Ludwigia alternifolia* (Cenotheracées), *Sagittaria natans* (Alismacées). Le tout était recouvert d'une quinzaine de centimètres d'eau. Un tel milieu est capable de se suffire à lui-même pendant plusieurs mois, sous condition d'un éclairage suffisant. Ce bac planté est ainsi resté pendant 9 mois; c'est seulement au bout de ce laps de temps que nous avons réalisé notre expérience.

Expérience I (2^e série).

Technique de l'expérience. — L'eau du bac est contaminée (1) avec 7 cc d'une culture en eau peptonée de Colibacille (H) âgée de 48 heures.

La recherche du Colibacille est effectuée au bout de 48 heures (2).

Résultats expérimentaux. — Il ne nous est pas possible d'obtenir une souche de Colibacilles.

Afin de constater que la disparition des Colibacilles n'était pas due à un accident, mais qu'elle se répétait, nous avons, trois jours après la disparition des Colibacilles de la première expérience, ajouté de nouveaux germes.

Expérience II.

Technique expérimentale. — Même technique que précédemment, mais le premier prélèvement est effectué après 24 heures.

(1) Une recherche préalable du Colibacille dans l'eau avait donné un résultat négatif.

(2) L'eau peptonée employée est phéniquée à 1 p. 1.000 et les trois passages classiques effectués à l'étuve à 37°.

Résultats expérimentaux. — La recherche du Colibacille est positive; elle indique la présence de 150 Colibacilles vivants au litre. Un second prélèvement, fait 48 heures après le premier, ne permet plus d'obtenir du Colibacille.

Cette disparition aussi rapide du Colibacille nous avait vivement intrigué et nous nous sommes permis de soumettre nos résultats à l'examen critique de M. le professeur VINCENT. L'illustre biologiste n'a pas été surpris de cette disparition rapide du Colibacille dans les conditions d'expérience où nous nous étions placés. Mais il nous a fait remarquer que l'apport de terre paraissait peu indiqué pour des recherches de ce genre puisqu'au Colibacille apporté par nos soins risquait de s'ajouter celui qui pouvait exister dans le sol. C'est pourquoi, pour les expériences suivantes, nous avons supprimé la terre et employé seulement du sable soigneusement lavé. En dehors de ces remarques, M. le Professeur VINCENT a insisté sur la nécessité d'employer une concentration en acide phénique de 0,85 p. 1000 et de placer les cultures à la température de 41°5. Ces prescriptions seront également respectées au cours des expériences suivantes.

La prochaine expérience que nous eûmes l'occasion de réaliser en suivant les conseils de M. le Professeur VINCENT fut effectué à Nancy, en 1931. Or, à cette époque, l'eau de la conduite sentant fortement le chlore, nous nous sommes décidés à en neutraliser l'action bactéricide par addition d'hyposulfite de soude.

Nous avons ainsi réalisé l'expérience suivante :

Expérience III.

Technique expérimentale. — Un bac de verre de 6 à 8 litres est préparé suivant le mode d'installation déjà indiqué. Il est rempli avec de l'eau chlorée qui est ensuite additionnée d'hyposulfite de soude. Au bout de 8 jours et après constatation de l'absence de Colibacilles, l'eau est

ensemencée avec 7 cm³ d'une culture en eau peptonée de Colibacilles (H) âgée de 48 heures. La température de l'eau du bac au moment de l'expérience est de 17°.

Résultats expérimentaux. — Des prélèvements successivement effectués au bout de 6 heures, 24 heures, 96 heures, cinq jours et huit jours ont tous mis en évidence la présence de nombreux Colibacilles.

Malheureusement, nous n'avons pu poursuivre cette expérience. Une nouvelle et quatrième expérience fut faite à Paris. L'eau de conduite était la même que celle utilisée dans les expériences I et II.

Expérience IV.

Technique expérimentale. — Le bac de verre utilisé est le même que celui employé pour les expériences I et II. Lorsque débute l'expérience, le bac est nouvellement planté depuis une semaine.

L'ensemencement est effectué avec 7 cm³ d'une culture en eau peptonée de Colibacille (H) âgée de 48 heures. La température de l'eau, au moment de l'expérience, est de 19°.

Résultats expérimentaux. — Des prélèvements sont effectués après 48 heures, 72 heures, 8 jours et 1 mois.

Au huitième jour, les Colibacilles sont encore nombreux (1). Au bout d'un mois, il devient impossible d'isoler du Colibacille.

Nous venons de voir comment se comportent les Colibacilles cultivés depuis longtemps dans les collections de laboratoire, mais on pouvait se demander avec quelque vraisemblance si le Colibacille qui se rencontre dans une eau de rivière n'offre pas une résistance plus grande que celui qui est habitué à se développer sur des milieux

(1) 5.000 Colibacilles au litre.

de culture artificiels et en l'absence de concurrence vitale.

A cet effet, deux bacs de verre ont été remplis avec de l'eau de la Meurthe contaminée par les égouts de Nancy. L'étude de la persistance des Colibacilles contenus dans cette eau fait l'objet des deux expériences suivantes :

Expérience I (3^e série).

Technique expérimentale. — Le bac de verre employé est d'une contenance d'environ 30 litres. Il est rempli avec de l'eau de la Meurthe contenant du Colibacille. La température de l'eau au moment de l'expérience est de 12° C. Le bac est exposé à la lumière diffuse.

Résultats expérimentaux. — Un premier prélèvement effectué après huit jours témoigne de la présence de Colibacilles (200 Colibacilles au litre).

Après 15 jours, il est impossible d'isoler une souche de Colibacilles.

Expérience II.

Technique expérimentale. — Le bac de verre employé est d'une contenance de 6 litres. Il est rempli avec la même eau que celle utilisée dans l'expérience précédente. La température de l'eau au moment de l'expérience est de 15°. Le bac est placé à la lumière contre une fenêtre.

Résultats expérimentaux. — Dès le huitième jour, il est impossible de trouver du Colibacille.

Discussion des résultats.

Si nous essayons de comparer les résultats fournis par le premier groupe d'essais à ceux fournis par le second,

nous constatons que dans ses grandes lignes la résistance du Colibacille est beaucoup plus forte en l'absence qu'en la présence d'organismes vivants.

Examinons avec un peu de détail les faits observés dans la première catégorie d'expériences et nous constatons que le Colibacille persiste plus longtemps dans de l'eau de conduite que dans de l'eau distillée. Il semble donc que la matière organique favorise le développement, réserve faite de la pression osmotique. C'est ce que l'expérience avec l'asparagine vérifie.

On conçoit que la persistance du Colibacille dans l'eau soit non seulement sous la dépendance du milieu de l'expérience, mais encore de la nature même du Colibacille utilisé. C'est ainsi que le Colibacille récemment isolé de selles persiste moins longtemps que le Colibacille provenant de collection. Ce fait est tout à fait normal; il est naturel que le changement si profond du tube intestinal à l'eau de rivière détermine dans la vie du Colibacille des modifications profondes. Nous constatons également que, parmi les Colibacilles de collection, les diverses races n'offrent pas une égale capacité de résistance.

On connaît les effets d'antagonisme, antibiose ou symbiose des populations bactériennes. Nous avons vu dans les expériences à concurrence vitale limitée à une espèce bactérienne que la vie du Colibacille n'a pas été notablement influencée. L'action de la concurrence vitale n'apparaît pas non plus nettement lorsqu'on s'adresse à l'expérience V, p. 108, où l'eau a été contaminée avec des matières fécales. Il est vrai que, dans ce cas, il y a un nouveau facteur d'action, c'est l'apport de matières organiques par les matières fécales.

Tout autres sont les résultats, lorsqu'on opère avec de l'eau renfermant une flore et une faune très diverses. Dans ces essais, le Colibacille disparaît rapidement ou du moins il est impossible de le déceler à l'aide de la méthode mise en jeu.

Quel mécanisme peut-on invoquer de la disparition du Colibacille de l'eau dans les circonstances naturelles?

1^o L'appauvrissement du milieu en matières nutritives ne paraît pas être un facteur dominant de la survivance des Colibacilles dans l'eau. En effet, dans la nature, toutes les eaux contiennent des matières organiques du même ordre de grandeur;

2^o Parmi les causes de disparition du Colibacille imputables à l'action d'autres organismes, nous distinguerons :

a) La concurrence vitale causée par les saprophytes ordinaires des eaux. Ce facteur nous paraît être nettement prédominant;

b) Action d'un Bactériophage (Coliphage).

Cette action paraît dans certains cas indéniable, mais il est à remarquer que, si elle contribue à un abaissement du taux de la population des Colibacilles, elle ne paraît pas aller jusqu'à leur disparition complète.

3^o On a pensé que l'absorption par les colloïdes de l'eau pouvait être rendue responsable de la disparition du Colibacille. Dans ces conditions, on ne s'expliquerait pas pourquoi l'absorption se limiterait au Colibacille. Il est possible que l'absorption intervienne dans la disparition du Colibacille, mais vraisemblablement, elle ne fait qu'expliquer une partie du phénomène.

En conclusion, les facteurs que l'on peut invoquer avec raison, de la disparition du Colibacille dans les eaux, sont nombreux. A notre sens, le facteur prédominant, dans la majorité des cas, paraît être la concurrence vitale.

Nous allons exposer dans les pages suivantes les résultats d'une expérience que nous avons effectuée dans le but de mettre en évidence l'action d'un bactériophage sur l'abaissement du taux d'une population de Colibacilles.

III. — Recherches sur l'influence possible d'un principe lytique sur la longévité du Colibacille dans les eaux.

(Recherches personnelles).

Nous inspirant des travaux d'ARLOING et DUFOUT (Voir page 95), nous avons réalisé l'expérience suivante, en utilisant l'eau de Meurthe. Le prélèvement fut effectué en été, fin juin. L'échantillon d'eau prélevé a été divisé en trois parties : une première partie était placée dans un ballon sans subir aucun traitement préalable. La deuxième, filtrée sur bougie CHAMBERLAND L3, était recueillie dans un vase stérile. La troisième enfin avait été portée au bain-marie à la température de 70° C. pendant 40 minutes, ce qui assurait la destruction de tout principe lytique pouvant y être contenu.

Les trois ballons obtenus furent ensuite contaminés avec chacun 2 cm³ d'une même émulsion opalescente de Colibacille H (institut Pasteur), faite à partir d'une culture sur gélose âgée de 48 heures. 17 heures, 60 heures, 7 jours, 20 jours et 7 mois après l'ensemencement, nous avons étudié les variations du nombre des Colibacilles contenus dans nos trois échantillons d'eau, en employant la méthode de DIENERT et ETRILLARD.

Les résultats de nos expériences sont consignés dans le tableau suivant :

Temps écoulé depuis l'ensemencement	Ballon contenant	Nombre de Colibacilles au litre
Après 17 heures	Eau naturelle.....	13.387.000.000
	Eau filtrée.....	28.292.000.000
	Eau chauffée.....	15.556.000.000
Après 60 heures	Eau naturelle.....	56.044.000.000
	Eau filtrée.....	105.786.000.000
	Eau chauffée.....	108.996.000.000

Temps écoulé depuis l'ensemencement	Ballon contenant	Nombre de Colibacilles au litre
Après 7 jours	{ Eau naturelle.....	50.200.000.000
	{ Eau filtrée.....	569.600.000.000
	{ Eau chauffée.....	493.600.000.000
Après 20 jours	{ Eau naturelle.....	5.197.000.000
	{ Eau filtrée.....	124.903.000.000
	{ Eau chauffée.....	4.370.000.000
Après 7 mois	{ Eau naturelle.....	0
	{ Eau filtrée.....	10.250
	{ Eau chauffée.....	138.000

A ce propos, nous croyons bon de rappeler que, dans une note antérieure (*Bulletin de l'Association des diplômés de microbiologie* de la Faculté de Pharmacie de Nancy, décembre 1932), publiée dans le laps de temps situé entre les numérations du 20^e jour et celles du 7^e mois, nous fûmes amenés à faire les réflexions suivantes inspirées par les premiers résultats obtenus :

« De l'examen de ce tableau résulte un fait assez inattendu : c'est la faiblesse en Colibacilles vivants de l'eau chauffée. En effet le nombre, de germes observés dans ce cas est tout d'abord inférieur aux deux autres. On se serait plutôt attendu à le trouver supérieur à celui obtenu pour l'eau naturelle.

« De même, avant d'être inférieur au pourcentage donné par l'eau filtré, celui donné par l'eau chauffée avait commencé par lui être supérieur. .

« En résumé, les choses se sont passées comme si le chauffage de l'eau avait fait disparaître une forte proportion de matériaux capables d'être utilisés par les Colibacilles pour leur nutrition.

Cette explication ne peut toutefois pas convenir aux résultats de l'expérience d'ARLOING et DUCOURT que nous avons exposée ci-dessus.

Nous pouvons peut-être émettre l'hypothèse suivante pour expliquer ces faits : l'eau, chauffée sans avoir été

filtrée, renfermerait des produits toxiques, issus de la destruction des corps microbiens par la chaleur. Ou bien n'a-t-on pas également le droit de penser que l'apport de matières organiques, résultant de la destruction des corps microbiens, est plus utile que nuisible au développement du Colibacille. »

Quoi qu'on en puisse dire, le fait était là et, un mois après l'ensemencement des trois ballons, c'est dans l'eau filtrée qu'il y avait d'une façon incontestable le plus grand nombre de Colibacilles. Or, voici qu'une numération effectuée 7 mois après le début de l'expérience met en évidence un changement complet dans les résultats obtenus en les mettant en parfait accord avec ceux d'ARLOING et DUFOUT. En effet, et de loin cette fois, c'est le ballon contenant de l'eau chauffée qui renferme le plus grand nombre de Colibacilles.

Nous nous bornons à noter ce nouveau fait sans chercher à l'expliquer.

La fonction indologène du Colibacille constitue-t-elle une propriété constante?

Au cours des différentes expériences que nous avons effectuées, qu'il s'agisse de souches provenant de collections ou de souches isolées par nos soins, celles que nous avons pu identifier avec le *B. Coli communis* ont toujours présenté un pouvoir indologène.

D'autre part, nous n'avons pas pu constater de diminution durable de la fonction indologène des souches observées.

Les Colibacilles isolés des eaux contaminées artificiellement montraient parfois au début un faible pouvoir indologène mais, par passage sur les milieux usuels, la production d'indol redevenait rapidement normale.

Nous pouvons donc considérer que le fait d'observer

une diminution passagère de la fonction indologène ne peut être envisagée comme une véritable variation (1).

A propos de la constance du pouvoir indologène chez les Colibacilles types, nous sommes heureux de pouvoir citer un passage d'une lettre de M. le Professeur DE GRAAFF en date du 6 décembre 1933. Le savant professeur hollandais s'exprime ainsi : « Nous n'avons jamais isolé un véritable Coli-Bacille non indologène des eaux, en Hollande. »

D'autre part, faut-il considérer que tous les germes isolés des eaux et qui ont pu être identifiés avec le Colibacille doivent être doués du pouvoir indologène? La question a été très discutée. En ce qui nous concerne, nous n'avons pas eu l'occasion d'isoler un Colibacille complètement dépourvu de la faculté de donner de l'indol. Malheureusement nos recherches ont porté sur un trop petit nombre de souches; les résultats obtenus sont tout autres en effet quand on pratique un grand nombre d'isolements. M. le Professeur VINCENT en effet a isolé des eaux des Colibacilles authentiques non indologènes. Pouvoir indologène mis à part les souches obtenues offraient en effet tous les autres caractères du Colibacille. On connaît les beaux travaux du savant Professeur du Collège de France sur la neurotoxine, or les Colibacilles non indologènes isolés provoquaient chez les animaux de laboratoire des symptômes en tous points comparables à ceux provoqués par la neurotoxine des *B. Coli communis* doués de pouvoir indologène.

(1) Des diverses constatations faites à propos de la fonction indologène du Colibacille, nous retiendrons les faits suivants : au cours d'une analyse d'eau, si on effectue la recherche de l'Indol après les trois passages classiques sur milieu phéniqué, quel sera à ce moment l'état de la culture? Le résultat du traitement par l'acide phénique n'aboutit qu'à un tri incomplet des germes, c'est-à-dire que le facteur concurrence vitale n'est pas totalement éliminé en ce qui concerne le Colibacille.

Dans ces conditions seulement, il nous paraît possible de considérer d'après ce que nous avons pu observer dans quelques cas particuliers, que la recherche de l'Indol effectuée à ce moment donnera une réaction d'autant plus forte que la vitalité du Colibacille considéré sera plus grande. On peut alors penser que l'indication fournie par cette réaction puisse permettre, ainsi que le prétend GUILLERD, de tirer des conclusions utiles à l'appréciation de la valeur hygiénique de l'eau examinée.

CHAPITRE VII

CULTURE DES BACTÉRIES SUR MILIEU SYNTHÉTIQUE POUR L'ÉTUDE DE LA FONCTION INDOLOGÈNE

Une souche de Colibacilles déterminée donne des quantités variables d'indol suivant la qualité des peptones utilisées. Ce fait est si connu de tous les bactériologistes qu'on est arrivé à considérer comme une opération préliminaire indispensable l'essai de la peptone avec une souche de Colibacilles dont on connaît la fonction indologène. D'autre part, les microbiologistes ont depuis longtemps préconisé l'emploi des milieux synthétiques afin d'examiner les Bactéries dans des conditions aussi semblables que possible.

C'est surtout pour les Bactéries chromogènes que l'effort maximum a été réalisé, notamment par GESSARD (Bacille pyocyanique) et Ph. LASSEUR pour les différentes espèces bactériennes produisant des corps colorés.

Les microbiologistes qui ont étudié le métabolisme de la cellule bactérienne avaient souvent intérêt à employer des milieux de composition aussi limitée que possible et comme source d'azote les corps relativement les plus simples.

BERTHELOT, s'inspirant des travaux de ses devanciers, a pensé qu'il serait possible de réaliser un milieu chimiquement défini où la fonction indologène serait étudiée dans des conditions telles que les résultats obtenus puissent être comparables (1).

(1) BERTHELOT signale certains résultats contradictoires obtenus en dépit de l'emploi d'un milieu de culture synthétique. Le savant chimiste met en évidence les causes d'échec qui sont dues tout à tour à l'impureté du pro-

BERTHELOT a étudié la fonction indologène de *Proteus Vulgaris* employant le milieu de composition suivante :

Eau	1.000,00
Phosphate dipotassique	1,50
Sulfate de Magnésie	0,50
Tryptophane.....	1,50
Chlorure de Calcium.....	0,02
Gélatine	25,00

Il était naturel que l'on cherche à cultiver un germe et à lui faire produire de l'indol dans un milieu chimiquement le plus simple possible (1). En effet, on connaît la grande complexité chimique d'une solution telle que l'eau peptonée qui constitue le milieu presque toujours employé pour la recherche de l'indol.

Dans de telles conditions, les causes d'erreur sont à redouter. On sait que, tout d'abord, d'une fabrication à l'autre, la composition chimique des peptones ne présente pas une constance très grande. De plus, en conséquence du

duit employé, à la technique de stérilisation du milieu de culture et à la qualité de la verrerie utilisée.

Parlant des milieux de culture synthétiques, BERTHELOT s'exprime ainsi : « On admettait généralement que l'utilisation des milieux synthétiques ne présentait guère de difficultés, mais les progrès de la physico-chimie, de la chimie biologique et de la physiologie des bactéries en ont fait apparaître. On ne saurait trop les rechercher et les faire connaître. Si dans de nombreux cas, il n'y a pas lieu de s'inquiéter des causes d'erreur sur lesquelles je viens d'insister, dans beaucoup d'autres on devra absolument les éviter, en particulier quand on voudra préciser certaines propriétés d'une espèce microbienne. »

(1) L'emploi systématique des milieux synthétiques pour l'étude de la fonction indologène des Bactéries aurait vraisemblablement pour conséquence de diminuer sinon de supprimer totalement le nombre des espèces microbiennes qui ont été tour à tour données comme indologènes ou anindologènes. En effet A. BERTHELOT a démontré que suivant la complexité de l'édifice moléculaire auquel appartient le noyau tryptophanique, certains germes en poussaient plus ou moins loin la désintégration dans le sens de l'indol. C'est ainsi que VALLE MIRANDA (thèse Sciences, Paris 1917) continuant les recherches de BERTHELOT, démontre que certains germes, ne dépassant pas le stade acide indol-acétique, lorsqu'ils sont cultivés en eau peptonée, parviennent à produire un peu d'indol lorsqu'ils sont cultivés sur milieu synthétique. Le milieu synthétique employé contient du tryptophane pur comme unique source de carbone et d'azote. Les deux germes étudiés VALLE MIRANDA sont deux variétés de *Proteus Vulgaris* Hauser. Ces deux germes attaquaient le tryptophane dans l'eau peptonée mais « tandis que le *Proteus saprophyte* poussait la désintégration de la molécule aminée jusqu'à l'indol, le *Proteus pathogène* n'allait que jusqu'au stade indol-3-acétique. »

développement de la culture microbienne, une foule de substances prennent naissance au sein du liquide dans lequel on veut effectuer la réaction. Or, nous ne possédons aucun réactif rigoureusement spécifique de l'indol. Il va donc falloir extraire l'indol du milieu de culture, avant de chercher à le déterminer. La recherche de l'indol au laboratoire devient, dans ces conditions, une opération assez compliquée. La conséquence en est que l'on se désintéresse d'un caractère dont la valeur paraît au moins égale à celle de la fermentation d'un sucre ou à la conduite d'un germe vis-à-vis de la coloration de GRAM.

Nous avons décidé d'utiliser le milieu synthétique L1 de Ph. LASSEUR (1) dans le but d'y pratiquer la culture de diverses Bactéries productrices ou non d'indol.

La formule de ce milieu est la suivante :

Asparagime	9 grammes.
Glycérine	25 —
PO ⁴ K ² H.....	2,50
SO ⁴ Mg	5,00
CaCl ²	0,40
SO ⁴ Fe.....	0,10
NaOH (N)	8 cm ³
Eau distillée q. s. pour	1.000 cm ³

La réaction de ce milieu est de l'ordre de pH = 6,4.

Les différentes substances sont dissoutes dans l'eau suivant l'ordre du tableau. Le chlorure de calcium et le sulfate ferreux sont dissous séparément en solution à 4% pour le premier et 1% pour le second. On ajoute donc 40 cm³ de la première solution et 10 cm³ de la solution de sulfate de fer.

Le milieu est ensuite additionné de 8 cm³ de solution normale de soude puis complété à 1.000 cm³. Par litre de milieu, nous avons ajouté 0 gr. 20 de Tryptophane (2).

(1) Et que, par abréviation, nous désignerons sous le nom de milieu L1.

(2) Nous nous en sommes tenus à cette concentration en tryptophane qui nous a permis d'obtenir des réactions de l'indol très intenses; avec des concentrations plus fortes, les réactions ne gagnent rien en intensité de coloration.

Nous avons spécialement étudié, dans le milieu synthétique L1, la fonction indologène de diverses souches de Colibacilles. Ces germes poussent très bien en milieu synthétique et l'on obtient des réactions de l'indol au moins égales en intensité à celles obtenues en eau peptonée.

Nous avons en particulier recherché quel était, pour le Colibacille cultivé en milieu synthétique L1, le pH le plus favorable à la production de l'indol. Nous allons donner maintenant les résultats de cette étude.

Influence de la réaction du milieu synthétique de culture sur la production de l'indol par le Colibacille.

Suivant que le milieu employé est plus ou moins acide ou alcalin, on obtient, en recherchant l'indol, des réactions colorées d'une intensité différente.

Les auteurs s'accordent pour considérer pH 7,8 comme la réaction de milieu la plus favorable à la production d'indol.

Nous avons constaté, en ce qui concerne l'eau peptonée, l'existence de ce point optimum de pH 7,8 pour lequel la réaction de l'indol se réalise avec le maximum d'intensité.

A vrai dire, il existe une marge assez grande et nous pensons que l'on puisse considérer un milieu dont le pH varie dans les limites extrêmes 7 et 8 comme un milieu convenant parfaitement à la réalisation de réactions qualitatives de l'indol.

Nous avons recherché, en ce qui concerne le milieu L1 (1) quelle était la réaction du milieu la plus favorable à la recherche de l'indol. Nous avons utilisé dans ce but différents échantillons de milieu L1 amenés à des pH déter-

(1) Voir page 123.

minés, par la méthode électrométrique (1). Les germes utilisés furent des Colibacilles et les réactions de l'indol furent effectuées suivant la méthode de GUILLERD (2) après 48 heures de séjour à l'étuve à 41°5.

(1) Les mesures ont été faites par notre camarade SERRA, docteur ès sciences, dans le laboratoire de M. le Professeur LASSEUR.

(2) Lire à ce sujet page 44.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1) C'est aux dépens du tryptophane contenu dans les peptones pancréatiques que les germes indologènes produisent de l'indol.

L'indol est mis en évidence dans les cultures microbiennes à l'aide de réactifs colorés.

2) Aucun des réactifs employés pour la mise en évidence de l'indol, n'est rigoureusement spécifique de ce corps.

L'eau peptonée est le milieu habituellement employé pour l'étude de la fonction indologène des Bactéries. La nature chimique d'un tel milieu étant excessivement complexe, il importe, lorsqu'on veut effectuer la recherche de l'indol, d'éliminer les substances susceptibles de donner avec le réactif des réactions colorées.

A cet égard, la méthode préconisée par Louis GAUTHIER nous paraît offrir le maximum de garanties. Nous avons, pour nos recherches, adopté son principe. Au point de vue technique, à la distillation directe de l'extrait éthéré, nous avons préféré « l'entraînement à la vapeur d'eau ». Le principal avantage de l'appareil que nous décrivons page 27 est de pouvoir traiter successivement plusieurs extraits étherés.

3) Après BERTHELOT, PORCHER, FRIEBER, etc..., nous avons constaté que l'on obtient parfois avec le réactif de SALKOWSKI, une réaction positive en l'absence d'indol. Dans ce cas, la coloration est due à l'acide indol-acétique. En effet, d'après les explications données par SALKOWSKI, la désagrégation du Tryptophane attaqué par les bactéries, se fait en deux étapes.

Une première étape allant du tryptophane jusqu'à l'acide indol-acétique, une seconde allant de l'acide indol-

acétique jusqu'à l'indol. Les germes indologènes seuls franchissent la seconde étape.

Ainsi qu'en témoignent des travaux tels que ceux de BERTHELOT et de W. FRIEBER, c'est l'acide indol-acétique qui donne une réaction positive avec le réactif de SALKOWSKI. Nous avons ainsi obtenu des réactions de SALKOWSKI positives avec des sarcines. Nous ferons toutefois remarquer que ces réactions étaient de faible intensité.

4) Les espèces bactériennes indologènes que nous avons étudiées ont toujours, pour des conditions de culture déterminées, montré une rigoureuse constance dans la production de l'indol. Pour cette raison, nous estimons que la production de l'indol dans la culture d'une Bactérie, constitue du point de vue systématique, un caractère au moins égal aux caractères couramment employés, tels que : fermentation des glucides, réduction de certains colorants, production de pigment, etc...

5) Les diverses souches du *B. Coli communis* que nous avons étudiées, ont toujours présenté la propriété de former de l'indol aux dépens de peptones à noyaux tryptophaniques.

Nous avons adopté pour l'estimation quantitative de l'indol dans les cultures de Colibacilles, la méthode de GUILLERD. Le fait que cette méthode utilise le réactif de SALKOWSKI (1) ne constitue pas un obstacle à son emploi pour l'estimation quantitative de l'indol, quand il s'agit de cultures d'une espèce bactérienne indologène connue, en particulier le Colibacille.

6) Le fait de se développer en culture mixte avec le Bacille d'EBERTH, ne paraît pas influencer la fonction indologène de *B. Coli communis*. Au bout de huit jours de développement en commun dans de l'eau peptonée, les colonies de *B. Coli communis* obtenues conservent leur pouvoir indologène.

(1) Donnant une réaction avec l'acide indol-acétique.

7) La culture et la conservation même prolongée (6 mois) en eau peptonée phéniquée à 2% d'une souche de Colibacille (H) n'a provoqué aucune modification du pouvoir indologène de la souche.

8) *B. Coli communis* donne de l'indol dans les milieux privés d'oxygène [atmosphère de gaz inerte (azote)].

9) Des expériences que nous avons réalisées, nous ne pouvons conclure à une diminution durable du pouvoir indologène des Colibacilles à la suite de leur séjour prolongé dans l'eau. Nous avons toutefois observé un parallélisme entre la vitalité des germes et l'intensité de la fonction indologène. Quant à la suite d'un certain nombre de passages sur eau peptonée, la souche en expérience se développe à nouveau avec une rapidité comparable à celle de la souche initiale entretenue sur gélose, l'intensité des réactions de l'indol augmente proportionnellement.

10) Cultivé en culture mixte (eau peptonée) avec *B. subtilis*, *B. Coli communis* finit par disparaître. Par contre, tant que la culture mixte contient des Colibacilles vivants, les germes isolés donnent des réactions de l'indol qui ne permettent pas de démontrer une influence des *B. subtilis* sur l'intensité de la fonction indologène de *B. Coli communis*.

11) Nous n'avons pu isoler de Colibacilles à partir du contenu intestinal de Tanches. Les poissons utilisés ont été sacrifiés après un séjour d'une semaine dans de l'eau pure.

12) Si nous considérons le comportement du Colibacille dans l'eau, nous remarquons que :

1^o La résistance du Colibacille est beaucoup plus grande en l'absence qu'en présence d'organismes vivants (qu'il s'agisse de Bactéries ou de Protozoaires).

2^o Quand il s'agit d'une eau stérile la persistance du Colibacille est d'autant plus longue que l'eau est plus riche en matières organiques.

3^o Les différentes souches de Colibacilles offrent des résistances variables à l'action bactéricide de l'eau.

4° Dans la nature, il y a non pas une, mais de nombreuses causes à la disparition du Colibacille dans les eaux. Suivant les conditions biologiques, l'importance relative de chacun des facteurs peut varier. Il en est un qui semble être prédominant, c'est le facteur concurrence vitale.

13) L'étude précise de la fonction indologène ne peut guère s'effectuer que sur milieu synthétique. Un tel milieu, chimiquement défini, présente de gros avantages. Il peut toujours être reproduit identique à lui-même. On connaît notamment la quantité de tryptophane que les bactéries ont à leur disposition. On est également certain que le milieu est initialement privé de toutes traces d'indol.

14) Le Colibacille pousse très bien sur le milieu synthétique L1 de LASSEUR. Nous avons additionné ce milieu de tryptophane afin de permettre aux bactéries d'accomplir leur fonction indologène (1). Nous avons cherché à déterminer quel était le pH le plus favorable à la production de l'indol dans le milieu synthétique ainsi constitué. Nous nous en sommes tenus à pH 7, pour les raisons suivantes : quand le milieu est à pH 7, on obtient de très belles réactions colorées. Au delà de ce point l'intensité de coloration augmente encore le plus souvent, mais de façon si faible que l'apparition d'un sérieux inconvénient rend préférable de s'en tenir à pH 7. En effet, lorsqu'on alcalinise le milieu, on observe une précipitation de plus en plus abondante. Cette précipitation ne paraît nullement entraver le développement des Colibacilles, mais elle nuit à une répartition homogène du milieu de culture lors de sa distribution dans les tubes.

15) Nous venons de voir que l'emploi d'un milieu synthétique était très recommandable pour la recherche et l'étude du pouvoir indologène d'une bactérie. Un tel milieu nécessite-t-il d'aussi grandes précautions que l'exige l'em-

(1) Voir le détail du milieu de culture, p. 123.

ploi de l'eau peptonée pour la détermination de l'indol dans une culture bactérienne?

Il résulte de l'étude comparative que nous avons faite des réactifs de DENIGÈS, EHRLICH, LEGAL et SALKOWSKI, que le réactif de LEGAL est le seul à ne pas donner de réaction colorée avec le tryptophane et le scatol. Il ne donne pas non plus de réaction colorée avec l'acide indol-acétique, ainsi qu'en témoignent les travaux de Walther FRIEBER. Il ne donne également aucune réaction avec les corps suivants : tyrosine, phénol, acide sulfhydrique. Pour toutes ces raisons, le réactif de LEGAL serait très recommandable pour la détermination de l'indol. Malheureusement il n'est pas très sensible.

On sait de plus que le réactif de LEGAL donne une coloration bleue, identique à celle fournie par l'indol, avec les corps possédant le groupe $\text{CH}^2 - \text{CO}$ dont la valeur du carbonyle est saturée par un radical hydrocarboné aromatique (1). Cependant, nous devons dire qu'au cours des différentes réactions de LEGAL que nous avons eu l'occasion d'effectuer, nous n'avons jamais obtenu de colorations bleues autrement qu'avec des germes indologènes (2).

Dans ces conditions, l'obtention d'une coloration bleue intense serait caractéristique de la présence d'indol. Nous pensons qu'il est peut-être possible, en ce qui concerne la seule réaction de LEGAL, de pratiquer la recherche de l'indol directement dans le milieu de culture (milieu synthétique L1 additionné de tryptophane); conscients de ce que nos recherches ont d'incomplet nous ne voudrions l'affirmer.

16) D'une façon générale il faut considérer comme entachée d'erreur, la pratique qui consiste à rechercher l'indol directement sur le milieu de culture à l'aide des réactifs habituels. Fort heureusement il existe d'excellentes techniques qui ont fait leurs preuves. A. BERTHELOT dont les

(1) DEMIGÈS, *Précis de chimie analytique*.

(2) Contrôle par la méthode de GAUTHIER.

beaux travaux sur les milieux synthétiques et la biologie de *Proteus vulgaris* sont bien connus, a utilisé la réaction d'EHRlich pour la recherche de l'indol dans les cultures de ce germe. Le savant chimiste insiste sur la nécessité d'extraire l'indol de la culture par l'éther. Nous avons décrit la technique de BERTHELOT, page 13, elle nous a toujours donné des résultats en parfait accord avec ceux fournis par la méthode de Louis GAUTHIER. Cette dernière méthode d'un emploi relativement compliqué, nous paraît devoir être réservée à des études particulières.

En conclusion, nous estimons que la technique indiquée par BERTHELOT pour la recherche de l'indol à l'aide du réactif d'EHRlich peut être considérée comme un modèle qu'il serait souhaitable de voir partout adopter dans la pratique bactériologique.

VU ET BON A IMPRIMER :
Nancy, le 19 mars 1934.

Le Doyen,
P. SEYOT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Nancy, le 19 mars 1934.

*Pour le Recteur
de l'Académie de Nancy,
Le Vice-Président du Conseil
de l'Université,*
L. SPILLMANN.

BIBLIOGRAPHIE

- Aichelburg (Ulrico di).** — Il terreno di Dominik e Lauter per la ricerca del B. Coli nell' acqua (*Bollettino dell' Istituto Sieroterapico Milanese*. Fascicolo XI, nov. 1932).
- Agueda Ferreira, Avila Horta et Cunha Paredes.** — Recherches sur le B. Coli de l'intestin des Mammifères et des Oiseaux (*Arch. Inst. royal bacteriologie Camara Pestana*. T. II. Fasc. II, 1908, p. 203).
- Arloing (F.) et Sempé.** — Propriétés empêchantes des eaux du Rhône et de la Saône sur le développement de certaines Bactéries (*C. R. Soc. biol.* T. 91, 1924, p. 667).
— Recherches sur la lyse microbienne avec des eaux d'Extrême-Orient (*Ibid.* T. 94, 1926, p. 428).
- Arloing (F.) et Dufourt (A.).** — Auto épuration colibacillaire des eaux fluviales (*C. R. Soc. biol.* T. 106, 1931, p. 192 et p. 289).
- Arloing (F.), Dufourt (A.) et Pierre-Etienne Martin.** — Auto-épuration colibacillaire et pH des eaux fluviales (*C. R. Soc. biol.* T. 107, 1931, p. 151).
- Baeyer.** — Ueber das Indol (*Ann. Chem. und Pharm.* Suppl. 7, 1870, p. 56).
- Barber (M.-A.).** — The rate of multiplication of Bacillus Coli at different temperatures (*J. of inf. diseases*. T. 5, 1908, p. 379).
- Baudish.** — Ueber eine neue Indolreaktion (*Zeitschr. f. physiol. chem.* T. 94, 1915, p. 132).
- Bela de Bito.** — Ueber das nitroprussidnatrium als reagens auf Aldehyde und ketone (*Ann. der chem.* 1892, p. 269).
- Belonovsky (G. D.), Lapinskaya (N. A.) et Rosenfeld (E.).** — Modifications des qualités biochimiques de B. Coli par des cultures de leucocytes *in vitro* (*C. R. Soc. biol.*, 1931, p. 911).
- Bergheim.** — The determination of fecal indol (*J. of biol. chem.* T. 32, 1917, p. 17).
- Berthelot.** — Sur l'emploi des milieux chimiquement définis à base de tryptophane (*C. R. Soc. biol.* T. 72, 1912, p. 595).
— Recherches sur quelques caractères spécifiques du *Proteus vulgaris* (*C. R. Acad. des Sciences*, 24 juillet 1911).

- Recherches sur le *Proteus vulgaris* (*Ann. Institut Pasteur*. T. 28, 1914, p. 839).
- Remarques sur l'emploi des milieux synthétiques (*Ibid.* T. 40, 1926, p. 440).
- Bettencourt (A.) et Borges (I.).** — Recherches sur le B. Coli des vertébrés inférieurs et des céréales (*Arch. Inst. royal bacteriologie Camara Pestana*. T. II. Fasc. II, 1908, p. 221).
- Peut-on distinguer le Colibacille de l'homme de celui des animaux au moyen de la fixation du complément? (*Ibid.* T. II. Fasc. II, 1908, p. 245).
- Bidzinski.** — Contribution à l'étude de l'action bactéricide des sels de cuivre (*Thèse Pharmacie, Nancy*, 1926).
- Boehme.** — Die Anwendung der Ehrlichschen Indolreaktion für bacteriologische Zwecke (*Centralb. f. Bact. orig.* T. 40, 1906, p. 129).
- Bonjean (E.).** — Le sol : étude bactériologique. T. II du *Traité d'hygiène* de Brouardel et Mosny.
- Borrel.** — Les Bactéries envisagées au point de vue de l'épuration biologique. Etat actuel de la question (*Revue d'hygiène*. T. 45, 1923, p. 1048).
- Braun.** — Le rouge neutre et le diagnostic rapide de la souillure des eaux de boisson par le colibacille (*Bulletin de l'Institut Pasteur*. T. 4, 1906, p. 561).
- Buard.** — Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes (*C. R. Soc. biol.* T. 65, 1908, p. 158).
- Casagrandi (Oddo).** — Le acque minerali « Vive » e i loro principii vitali (*Rivista italiana di Idrologia e patologia del Ricambio*. Anno VI. N. 1-8, 1930).
- Cavel (Lucien).** — Le traitement des eaux d'égout par les boues activées (*Revue d'hygiène*. T. 47, 1925).
- Sur l'absorption des matières colloïdales par les « boues activées » (*Ibid.* T. 53, 1931, p. 179).
- Callow (Anne B.) et Robinson (Muriel E.).** — The nitroprussiate reaction of Bacteria (*Bio. chem. J. London*. T. 19, 1925, pp. 19-24).
- Chen et Retger.** — A correlation study of the colon-aerogenes group of Bacteria, with special reference to the organisms occuring in the soil (*Journ. of Bact. Balt.* T. 5, 1920, p. 253).
- Cohen (Barnett) et Clark (Mansfield).** — The growth of certain Bacteria in media of different hydrogen ion concentrations (*Journ. of Bact. Balt.* T. 4, 1919, p. 409).
- Crossonini (E.).** — Ueber der nachweis von Indol in den back-

- terischen kulturen mit der Ehrlichen methode (*Arch. f. Hyg.* T. 72, fasc. 2, p. 261; *B. P.*, 1910, p. 535).
- Danila.** — Nouvelle réaction du tryptophane libre (*C. R. Soc. biol.* T. 38, 1923).
- David (Robert).** — Contribution à l'étude numérique de la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquide (*Thèse Sciences*, Paris 1931).
- Denes.** — Sur une nouvelle propriété des eaux potables (*Polyclinique sec. pratique*, année 1928, cité par Oddo Casagrandi).
- Denigès.** — Nouveaux réactifs de l'indol (*C. R. Soc. biol.* T. 64, 1908, p. 293).
- Sur la recherche de l'indol par les réactions de Legal et d'Ehrlich (*Ibid.* T. 64, 1908, p. 295).
- Réactions différentielles du scatol et de l'indol (*Ibid.* T. 64, 1908, p. 689; *Précis de chimie analytique*, Maloine, Paris 1920).
- Deruby (K.-G.).** — La concentration optima en ions hydrogène favorisant le développement de certains microorganismes (*Ann. Institut Pasteur.* T. 35, 1921, p. 277).
- Dienert (F.) et Mathieu (G.).** — Recherche des Bacilles typhiques et para dans les selles et dans les eaux (*C. R. Académie des Sciences.* T. 164, 1917, p. 124).
- Dienert (F.), Guillerd (A.) et Legueu (A.).** — De la recherche des B. d'Eberth et para B. dans les eaux (*C. R. Académie des Sciences.* T. 166, 1918, p. 84).
- Dienert (F.).** — Sur le mécanisme de l'épuration des eaux d'égout par les boues activées (*Ann. Hyg. publique.* T. 4, 1926, p. 732).
- Dienert (F.) et Etrillard.** — Recherche et numération directe sur milieu solide du B. Coli contenu dans un grand volume d'eau (*Ann. Institut Pasteur*, 1929, p. 1278).
- Distaso.** — Sur la production de l'indol par le bacille Coli en milieu au tryptophane et sucré (*C. R. Soc. biol.* T. 2, 1913, p. 200).
- Dmitrewskaïa.** — Le rôle des Protozoaires dans le processus de l'auto-purification des réservoirs d'eau pour l'élimination des microbes pathogènes (*Archives des sciences biologiques.* T. 30, fasc. 1, 1930, p. 27). — Cité par l'Office internat. d'hyg. publique. T. 23, 1931.
- Dobrowotski.** — Des microbes producteurs de phénol (*Ann. Institut Pasteur.* T. 24, 1910, p. 595).
- Douris et Beck.** — Susceptibilité des différents microbes vis-à-vis de l'hydrogène sulfuré (*Ann. Institut Pasteur.* T. 46, 1931, p. 73).

- Ehrlich.** — Ueber die Dimethylaminobenzaldehyd Reaktion (*Deut. medicin. Wochen.* N° 15, 1901. — Cité par Louis Gauthier (*Thèse Pharmacie.* Lyon, 1912).
- Escalon et Sicre.** — Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes à l'aide du furfural (*C. R. Soc. biol.* T. 2, 1908, p. 507).
- Escherich (Th.).** — Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehung zur Physiologie der Verdauung. Stuttgart, 1886. — Cité par Kolle et Wassermann (*Handbuch der pathogenen organismen*).
- Escherich (Th.) et Pfaundler (M.).** — Bacterium Coli commune in Handbuch der pathogenen Microorganismen (Kolle et Wassermann).
- Fabry.** — Modifications biologiques du B. Coli en milieu phéniqué (*C. R. Soc. biol.* T. 2, 1924, p. 884).
- Fabry.** — Le Bactériophage de « d'Hérelle » dans les eaux alimentaires (*Revue d'hygiène.* T. 50, 1928, p. 667).
- Farland Mac, Joseph et Small J. Hamilton.** — An improvment in the technic of the indole test. (*J infect. dis. Chicago.* III suppl., n° 1, 1905, pp. 325-326).
- Fellers (G.-R.) et Clough (R.-W.).** — Indol and skatol determination in bacterial cultures (*J. of. bact. Balt.*, 1925, pp. 105-133).
- Ferrera, Horta et Paredes.** — Recherches sur le *Bacillus Coli communis* de l'intestin de l'homme (*Arch. Inst. royal bacteriologie Camara Pestana.* T. 2, 1908, p. 153).
- Fileti.** — Transformazione dell scatol in indol, e preparazione dell' indol (*Gazetta chimie Ital.* T. 13, 1883, p. 378).
- Fisher (E.).** — Synthese von Indolderivaten (*Ann. chem.* T. 236, 1886, p. 116).
- Fiume (Guglielmo).** — Sui processi di depurazione dei fanghi fursionanti da filtri soumersi (Atti Istituto Igiene, *R. Università di Padova*, 1930).
- Fleig.** — Réactions colorées du tryptophane, de l'indol, du pyvrol, du thiophène et du carbazol, avec les aldéhydes aromatiques (*C. R. Soc. biol.*, T. 65 1908, p. 192).
- Franckland.** — Ueber das Verhalten des Typhus bacillus und des Bacillus Coli communis im Trinkwasser (*Zeitschr. f. Hyg.* T. 19, 1895).
- Freund.** — Ueber eine durch ein anaërobes Bakterium hervorgernefeue Meningitis (*Cent. f. Bakt. orig.* T. 88, 1922, p. 9).
- Freund et Lebach.** — Mittheilungen : Ueber Indolfarsbtstoffe (*Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft.* (T. 36, 1901, p. 308).

- Freudenreich (E.).** — Recherche du B. Coli dans l'eau (*Ann. de Micrographie*. 1896, p. 414).
- Fricker (J.) et Laurin (J.).** — Pouvoir indologène et Bactériophage (*C. R. Soc. biol.* 1931, p. 449).
- Frieber (Walther).** — Beiträge zur Frage des Indolbildung und der Indolreaktionen sowie zur Kenntnis des Verhaltens indolnegativer Bakterien (*Cent. f. Bakt. orig.* 87.4, 1921).
- Gabbano (L.).** — Développement du Colibacille dans les eaux minérales (*Igiene moderna*, n° 8 août 1928, p. 238). — Cité par *Office internat. hyg. publique*. T. 20, 1928.
- Gautié (A.).** — Sur la détermination quantitative du Coli dans les eaux d'alimentation (*Ann. I. P.* 1905, p. 124).
- Gautier et Nogier.** — Procédés de différenciation de l'indol et du scatol et de caractérisation de ces corps dans leurs mélanges (*C. R. Soc. biol.* T. 65, 1908, p. 646).
- Gauthier (Louis).** — Recherches sur l'indol en microbiologie (*Thèse Pharmacie*. Lyon, 1912).
- Gaussen (Charles).** — Quelques techniques de laboratoire simplifiées (*C. R. Soc. biol.* T. 98, p. 13).
- Gernez et Duthoit.** — Les réactions biologiques dans la classification des Bac. Colis (*C. R. Soc. biol.* 1923, p. 527).
- Giacomo (A. de).** — Sur la production de phénol par le Colibacille et le paratyphique dans divers milieux de culture (*C. R. Soc. biol.* T. 2, 1909, p. 720).
- Goldie (H.).** Sort des microbes pathogènes dans les eaux d'égout. Etude des phénomènes de bactériolyse (*Revue d'hygiène*. T. 55, 1933, p. 5).
- Graffa (W. C. de).** — Les propriétés du Colibacille thermotolérant (*Acta brevia neerlandica de physiologica, pharmacologia, microbiologia*, E. A. Vol. I, 4-6, 1931).
- Het Coli vraagstuk bij het hygiënisch drinkwaterderzoek (*Pharmaceutisch Tijdschr.* Nr. 3-4, 1932).
- Bacteriologisch drin (kwateronderzoek) *Uit de afdeeling voor Microbiologie van het Pharmaceutisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht*.
- Gorter (E.) et Graaff (W. C. de).** — Sur la méthode de Herter et Foster pour la détermination quantitative de l'indol (*C. R. Soc. biol.* T. 64, 1908, p. 402).
- Grimbert.** — Recherche du Bacille d'Eberth dans l'eau (*C. R. Soc. biol.*, 1894, p. 399).
- Groot.** — Recherches sur le Bacterium (*Proteus*) anindologenes (*Ann. Institut Pasteur*. T. 32, 1918, p. 299).

- Guerbet.** — Contribution à l'étude des Bacilles du groupe Coli-typhique (*Thèse de Pharmacie*, Paris, 1911).
- Guiraud.** — A propos de la signification du *Bacillus Coli* dans les eaux potables. Etude de ce Bacille dans les eaux de Toulouse (*Revue d'hygiène*. T. 31, 1909, p. 258).
- Harper et Zoller.** — Quantitative estimation of indole in biological media (*Journ. of. biol. chem.* T. 41, 1920, p. 25).
- Influence of hydrogen ion concentration upon the volatility of indole from aqueous solution (*Ibid.* T. 41, 1920, p. 37).
- Hauduroy (P.).** — *Les ultravirus et ses formes filtrantes des microbes*. Masson, Paris, 1929.
- Herter (C.-A.) et Foster (Louise).** — On a method of determining indol *Proceed. of the Soc. for experim. Biol. and Med.* New-York. 24 mai 1905.
- A method for the quantitative determination of indol (*Journ. of biol. chim.* T. 1, 1906, p. 257.)
- On the separation of indol from scatol and their quantitative determination (*Ibid.* T. 2, 1906, p. 267).
- Hervieux.** — Recherches biochimiques sur l'indol et l'acide glycyronique (*Thèse Sciences*. Paris, 1908).
- Homer.** — A spectroscopic examination of the color reactions of certain indol derivatives and of the urine of dogs after their examination (*J. of. biol. chem.* T. 22, 1915, p. 345).
- Hopkins (F.-G.) et Cole (S.-W.).** — A contribution to the chemistry of Proteids. Part. I. Preparation of tryptophane (*J. of physiology.* T. 27, 1901, p. 418).
- A contribution to the chemistry of Proteids. Part. II. The constitution of Tryptophane and the action of Bacteria upon it (*Ibid.* T. 29, 1903, p. 451).
- Huntemüller (Otto de).** — Vernichtung der Bakterien in Wasser durch Protozoen (*Archiv. f. Hyg.* T. 54, 1905, pp. 89-100).
- Jackson et Richard (W.).** — Indole derivatives in connection with a diet deficient in tryptophane (*Journ. of biol. chem.* T. 73, 1927, p. 523).
- Jongbloed.** — *Thèse Amsterdam*. 1928. — Cité par J. Smit.
- Kaiser.** — *Archiv. f. Hyg.* T. 52, 1905. — Cité par *Revue d'hygiène*. T. 27, 1905, p. 856.
- Kaplan-Brille (Alice).** — Influence du nombre des microbes ensemencés sur la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide (*Thèse Pharmacie*, Paris, 1931).
- Kitasato.** — *Zeitschrift f. Hyg.* T. 7, 1889, p. 515. — Cité par Macé (*Traité pratique de Bactériologie*).

- Klecki.** — Recherches sur la pathogénie de la péritonite (*Ann. Institut Pasteur*. T. 9, 1895, p. 710).
- Kligler (I. J.).** — Observation on indol production by Bacteria of the typhoid group (*Journal of inf. dis.* T. 14, 1914, p. 81).
- Konto.** — Ueber eine neue reaktion auf Indol (*Zeit. f. physiol. chem.* T. 48, 1906, p. 185.)
- Kolle et Wassermann.** — Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Iéna, 1903.
- Kraus (Ida).** — Colorimetric determination of tryptophane by the vanillin-HCl reaction and the quantitative separation from indole and skatole (*J. of biol. chem.* T. 63, 1925, p. 159).
- Krulers Dagneaux.** — *Thèse Amsterdam*, 1930, cité par J. Smit.
- Lagrange (E.).** — Action à distance, s'exerçant entre Colibacilles (*C. R. Acad. des Sciences*, 11 juillet 1931).
- Lartigan.** — The Bacillus coli communis in human infections (*J. american med. assoc.* April 1902).
- Lasseur (Ph.).** — Contribution à l'étude du B. Chlororaphis (*Thèse Sciences*, Nancy 1911).
- Influence du fer sur la végétation et la coloration des cultures de diverses bactéries (*Société de biologie*. Nancy, 17 février 1913).
- Sur l'extraction des pigments bactériens (*C. R. Soc. biol.* T. 76, 1914, p. 819).
- La notion quantitative en microbiologie (Extr. du *Bulletin des Sciences pharmacologiques*, n° 4, avril 1923).
- Lasseur (Ph.) et Girardet (F.).** — Contribution à l'étude des pigments microbiens, Nancy 1925 (J. Coubé, édit.).
- L'eau pure en biologie (*Bulletin de la Société de chimie biologique*. T. 6, 1924, pp. 314-325).
- Lasseur (Ph.) et Thiry (G.).** — Nouvelles colorations présentées par certains microorganismes cultivés en milieux synthétiques (*C. R. Soc. biol.* T. 74, 1913, p. 163).
- Sur les cultures colorées de Bactéries considérées jusqu'à présent comme achromogènes (*C. R. Acad. des Sciences*. T. 156, 1913, p. 166).
- Lasseur (Ph.), Marchal (J.) et Dupaix (A.).** — *Travaux du laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*. Fascicule III, 1930.
- Lasseur (Ph.), Vernier (P.), Dupaix (A.) et Georges (L.).** — Influence de la variation expérimentale de la tension superficielle sur la vie des Bactéries cultivées en milieu synthétique et en solution peptonée (*Archiv. f. Mikrobiologie* 3 band 5 Heft. 1932).

- Looney.** — Colorimetric estimation of tryptophane (*Journ. of biol. chem.* T. 69, 1926, p. 519).
- Macé (E.).** — *Traité de Bactériologie*. Baillière, Paris, 1913.
- Mac Conkey (A.).** — Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus Celi communis* and the *Bacillus typhi abdominalis* (*Lancet. London.* T. 2, 1900, p. 20).
- Lactose-fermenting Bacteria in faeces (*Journ. of. hyg.* T. 5, 1905, pp. 333-379).
- Further observations on the differentiation of lactose-fermenting Bacilli, with special reference to those of intestinal origin (*Ibid.* T. 9, 1909, p. 86).
- Magalhaes (S. de.).** — 4.290 souches de Colibacilles de l'intestin de l'homme (*Soc. port. Biol.* 1924 in *C. R. Soc. biol.* T. 91, 1924, pp. 234).
- Recherche sur les Colibacilles dans les fèces de divers animaux (*Arquivos do Instituto bacteriologico Camara Pestana.* T. 6, fasc. 3, 1932, p. 45). — Cité par *Office internat. hyg. publique.* T. 25, 1933, p. 882.
- Malone (R.-H.) et Goré (S.-M.).** — The detection of indol in bacterial cultures (*Ind. J. of med. res.* T. 8, 1931, pp. 490-504).
- Madoul (A.) et Cruat (E.).** — Contribution à l'étude bactériologique des eaux. Les bacilles Coliformes (*Ann. Institut Pasteur.* T. 29, 1915, p. 459).
- Mattar.** — Contribution à l'étude du Colibacille dans les eaux de boisson (*Thèse Pharmacie, Nancy*, 1930).
- Miquel.** — *Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux*, Gauthier-Villars, Paris, 1891.
- Mühsam (R.) et Shimmelbusch.** — Ueber die farbenproduktion des *B. pyocyaneus* bei der Symbiose mit anderen Mikroorganismen (*Archiv. f. Klin. chirurgie.* T. 46, 1893).
- Nègre.** — Sur la resistance differente au sel marin des groupes typhiques, paratyphique A., paratyphique B, *B. Celi* (*C. R. Soc. biol.* T. 82, 1919, p. 387).
- Neckl.** — Ueber die Dampfdichte des Indols (*D. chem. Ges.* T. 6, 1874, p. 1517).
- Nicolle.** — Action du *Subilis* sur diverses Bacteries (*Ann. Institut Pasteur.* T. 21, 1907, pp. 613-621).
- Nonnotte et Demanche.** — Sur la recherche de l'indol dans les cultures microbiennes (*C. R. Soc. biol.*, 1908, p. 495).
- Dosage de l'indol dans les cultures microbiennes (*Ibid.* 1908, p. 658).

- Nyberg.** — Uber Nachweis und Gewinnung von Bakteriophagen (*Cent. f. Bakt.* T. 122, 1931, pp. 270-276).
- Palgen.** — Essai sur la biologie de quelques Bactéries (*Thèse Pharmacie*, Nancy, 1925).
- Péré.** — Contribution à la biologie du *Bacterium Coli* et du Bacille typhique (*Ann. Institut Pasteur.* T. 6, 1892, p. 512).
- Piccoli.** — Sulla sporularzione del B. Coli (*Cent. f. Bakt.* T. 19, 1896, p. 307).
- Pierron (René).** — L'eau de source à Nancy (sources communales et particulières). Etude historique, chimique et bactériologique (*Thèse Pharmacie*, Nancy, 1927).
- Porcher (Ch.).** — Action de l'eau oxygénée sur l'indol (*Bull. Soc. chim.* 4^e série. T. 3, 1908, p. 229).
- Le tryptophane (*Biologie médicale*, juin-juillet 1909.)
- Sur le dosage de l'indol par la méthode colorimétrique (*Bull. Soc. chim.*, 5 janvier 1911).
- Porcher (Ch.) et Nicolas.** — *Cours de chimie organique et biologique.*
- Porcher (Ch.) et Panisset.** — Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens. Sa présence dans la culture du choléra des poules (*C. R. Soc. biol.* T. 66, 1909, p. 624).
- De la recherche de l'indol et de l'acide sulfhydrique dans les cultures microbiennes (*Ibid.* T. 68, 1910, p. 653).
- Sur la recherche de l'indol dans les milieux liquides de culture (*Ibid.* T. 70, 1911, p. 369).
- Sur la rapidité d'apparition de l'indol dans les cultures microbiennes (*Ibid.* T. 70. 1911, p. 371).
- Sur les conditions de mise en liberté de l'indol dérivant des composés indologènes dans les cultures (*Ibid.* T. 70. 1911, p. 438).
- Refis Efendi.** — Sur les divers types de Bac. Coli des eaux (*Ann. Inst. Pasteur.* T. 10, p. 242).
- Robinson.** — *The Laboratory diagnosis of acute intestinal infections*, London, 1920.
- Rochaix.** — Recherche rapide de la contamination bactériologique des eaux de boisson (*Revue d'hygiène.* T. 39, 1917).
- Standardisation des méthodes d'analyse bactériologique des eaux (*Ibid.* T. 47, 1925, p. 1148).
- Rochaix et Dufourt.** — Urobactéries et réaction du neutralroth (*Soc. méd. des hôp. de Lyon*, 1910).

- Rochaix et Urtinette.** — Antagonisme du Colibacille et des Bactéries putrides (*C. R. Soc. biol.* T. 106, 1931, p. 669).
- Rodet (A.) et Proux (G.).** — Sur les relations du *Bacillus Coli communis* avec le Bacille d'Eberth et avec la fièvre typhoïde (*C. R. Soc. Biol.* 1890, p. 9).
- Rothberger.** — Differential diagnostische untersuchungen mit Gefärbten Nährböden (*Cent. f. Bakt. 1^{te} Abth.* XXIV—1898, p. 513 et XXV, 1899, pp. 15 et 69).
- Salkowski.** — Zur Kenntnis, der Eiweissfäulniss (*Zeit. f. physiologische chem.* T. 8, 1884, p. 417).
- Salus (Gottlieb).** — Zur Phenol und Indolbildung durch Bakterien und zum Nachweis dieser Körper in Kulturen (*Cent. f. Bakt.* T. 88, 1922, p. 103).
- Savage (William-G.).** — The Pathogenicity of B. Coli in relation to the bacteriological examination of water (*Journ. of hyg.* T. 3, 1903, p. 388).
- Schaeffer (H.-F.).** — De l'épuration spontanée de l'eau de boisson (*Revue d'hygiène.* T. 45, 1923, p. 567).
— L'emmagasinement de l'eau de boisson considéré comme moyen d'épuration (*Ibid.*, T. 47, 1925, p. 1167).
- Scheffler.** — Das Neutralroth als Hilfsmittel zur diagnose der Bacterium Coli (*Cent. f. Bakt. 1^{te} Abth.* XXVIII, 1900, p. 199).
- Seppilli (A.) et Denes (G.).** — Contributi allo studio della fase « R » dei protofitti. V. — Fenomeni di dissociazione de Bacterium Coli nelle acque (*Estratto della Rivista « Annali Igiene ».* Anno XLIII, 1933).
- Sicre (A.).** — Sur la recherche de l'indol dans les cultures microbiennes à l'aide des nouveaux réactifs (*C. R. Soc. biol.* T. 67, 1909, p. 76).
- Silva (E.-L.).** — Le milieu de Mac Conkey et la recherche du Coli dans les eaux (*Arch. do Inst. bact. Camara Pestana.* T. 3, fasc. 3, 1912, pp. 279-286).
- Smit (J.).** — Einleitende Versuche zur Aufklärung der Selbstreinigungsvorgänge in verschmutzten Gewässern (*Vom Wasser.* T. 5, 1931, p. 178).
- Steensma.** — Über Farbenreaktionen der Eiweisskörper, des Indols und des skatols mit aromatischen Aldehyden und Nitriten (*Zeit. f. physio. chem.* T. 47, 1906, p. 25).
— Ueber den Nachweis von Indol und die Bildung von Indol

- vortaüschenden Stoffen in Bakterienkulturen (*Cent. f. Bakt. orig.* T. 41, 1906, p. 295).
- Stein (M.-F.).** — The interpretation of B. Coli test results on a numerical and comparative basis as applied to the investigation of water and seevage (*Journ. of. bact.* T. 4, 1919, p. 243).
- Stoel (G.).** — *Bacillus coli* et Bacteriophage anti dans les cultures cellulaires (*C. R. Soc. biol.* T. 106, 1931, p. 906).
- Teissier (J.) et Cuvreur (E.).** — Sur la survivance dans les eaux du Colibacille (*C. R. Soc. biol.* T. 82, 1919, p. 357).
- Thomas (P.).** — *Cours de chimie biologique.* T. 1 et 2. (Presses universitaire de France, 1926).
- Tirelli (Elío).** — Bacterium Coli e potabilità delle acque (*Giornale medico del R^o esercito.* 1906, p. 349). — Cité dans *Revue d'hygiène.* T. 28, 1906, p. 1007.
- Valle Miranda (Francisco-Gomes).** — Contribution à l'étude du *Proteus vulgaris* Hauser (*Thèse Sciences*, Paris, 1917).
- Vignati.** — Antagonisme entre B. typhique et B. Coli (*C. R. Soc. biol.* T. 1, 1926, p. 212).
- Vincent.** — Sur un nouveau procédé d'isolement du Bacille typhique dans l'eau (*C. R. Soc. biol.* 1890, p. 62).
- Sur la recherche du Bacille Coli dans l'eau (Congrès international d'hygiène. Londres, 1891).
- Sur la signification du Bacille Coli dans les eaux potables (*Ann. Institut Pasteur.* T. 19, 1905, p. 233).
- La détermination bactériologique et le dosage du Bacille Coli dans l'eau de boisson (*Hygiène générale et appliquée.* 1909, p. 74).
- Remarques à propos de la communication de M. Sicre (*C. R. Soc. biol.* T. 66, 1909, p. 153).
- Titres et Travaux scientifiques. 1918.
- Waal (J.-W. de).** — Het Water in de Neder-Betuwe (*Thèse*, Groningen, 1918).
- Ward (F.-W.).** — The absorption spectra of some indole derivatives (*Bio. chem. J. London.* T. 17, 1923, pp. 891-897).
- Wibaut Isebre Moens.** — Les Protozoaires dans les réservoirs des navires (*Nederl. Tijdschr. V. hyg. Microbiol, en Serol.* Leyden, vol. 2, 1927, p. 24). — Cité par *Office intern. hyg. publique.* T. 20, 1928).
- Wikullil.** — Eine neue methode zur Bestimmung der coli-zahl

in Wassern (*Cent. f. Bakt.* 1927). — Ouvrage étudié dans la technique sanitaire de janvier 1929.

Winslow et Brooke. — The viability of various species of Bacteria in aqueous suspensions (*Journ. of Bact.* T. 13, 1927, p. 235).

Zoller. — Influence of hydrogen ion concentration upon the volatility of indole from aqueous solution (*Journal of. biol. chem.* T. 41, 1920, p. 37).

Zuber. La réaction de l'indol dans la pratique bactériologique. Application à la recherche du B. Coli dans les eaux (*Thèse Médecine*, Nancy, 1919).

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	v
AVANT-PROPOS.....	vii

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I. — Généralités sur l'indol.....	1
CHAPITRE II. — Les réactions qualitatives de l'indol....	7
CHAPITRE III. — Recherche de l'indol dans les cultures bactériennes.....	23
CHAPITRE IV. — Recherche de l'indol dans les cultures de diverses espèces microbiennes.....	32

DEUXIÈME PARTIE

Remarques sur la biologie du Colibacille et sa fonction indologène.....	37
CHAPITRE I. — Méthode employée pour l'obtention d'une souche de Colibacilles.....	38
CHAPITRE II. — Influence des bacilles typhiques et para- typhiques sur la fonction indologène du Colibacille.	49
CHAPITRE III. — Influence du séjour dans l'eau sur la fonction indologène du Colibacille.....	63
CHAPITRE IV. — Signification de la présence du Coli- bacille dans une eau.....	77
CHAPITRE V. — Persistance du Colibacille dans des eaux de provenances diverses. Facteurs déterminant cette persistance.....	89
CHAPITRE VI. — Persistance du Colibacille dans diverses eaux.....	107
CHAPITRE VII. — Culture des bactéries sur milieu syn- thétique pour l'étude de la fonction indologène....	124
Conclusions générales.....	129
Bibliographie.....	137
